



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Modelado de la cardiotoxicidad inducida
por antraciclinas en hiPSC-CM de
pacientes oncológicos pediátricos y estudio
del papel cardioprotector del miR-4732-3p

Ignacio Reinal Ferré

Directora de Tesis: Pilar Sepúlveda Sanchis

Tutora UPV: María Belén Picó Sirvent

Marzo, 2023

“Solo es posible avanzar cuando se mira lejos.
Solo cabe progresar cuando se piensa en grande.”

José Ortega y Gasset

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora, la Dra. Pilar Sepúlveda, la oportunidad de realizar mi doctorado en el grupo de Regeneración y Trasplante Cardíaco y entrar a formar parte de esa gran familia llamada RETRACAR. Gracias por la orientación y los consejos recibidos, que me han permitido crecer a nivel profesional y me han ayudado a desarrollar un espíritu crítico no solamente necesario para el mundo de la ciencia, sino también para muchos otros aspectos de la vida. También agradecer la confianza depositada en mí y permitirme desarrollar mis propias ideas con libertad. Ha sido un placer realizar la tesis en su laboratorio y espero que podamos seguir colaborando en el futuro.

Agradecer también a la post-doc más valenciana del grupo, Imelda, por todo el apoyo y la ayuda recibidos tanto a nivel profesional como personal. Por introducirme en el apasionante y en ocasiones frustrante mundo de las iPS y por ayudarnos a todos a ver el lado bueno de la ciencia cuando lo hemos perdido de vista. Gracias a tu tenacidad hemos llegado a realizar experimentos que considerábamos inabarcables. A Rosa, por ayudarnos a navegar por el enrevesado mundo de los pedidos y la burocracia interna de la Fe y por apretar con la histología cuando nos han avasallado los revisores. Eres una gran persona y sin ti estaríamos muy perdidos. A Marina, proveedora oficial de dulces y golosinas del laboratorio. Gracias por estar ahí desde el principio cuando estábamos solos en ese laboratorio, por todo lo que me has enseñado y por animarme todos los días con nuestras charlas sobre juegos y otras frikadas. Espero que nunca dejemos de quedar para derrotar sectarios, orcos o lo que se tercié. A Amparo, la médica oficial de RETRACAR y modelo vital a seguir. Muchas gracias por haber estado ahí para resolver cualquier duda médica surgida en el transcurso de la tesis y por servir de ejemplo de alegría y jovialidad cuando hemos estado apagados. Disfruta mucho de tu jubilación que te lo has ganado con creces.

A mis compañeros del laboratorio. A Rafael Sánchez, por todo lo que me ha enseñado, por toda la frustración compartida intentando poner a punto los protocolos, por ser mi compañero friki del laboratorio y hacerme reír todos los días y estar ahí para lo que necesites. Eres un gran profesional y un gran amigo. A Marta Gómez, por su naturalidad y forma de ser, siempre ayudándonos a poner las cosas en perspectiva para seguir avanzando. Sin ti el camino hubiera sido mucho más duro y te deseo lo mejor. A Marc Buigues, fuente infinita de entretenimiento con todas sus historias y líos, y muy

peligroso armado con cazalla. Gracias por todo lo que me has ayudado y espero que sigamos saliendo de fiesta juntos. A Elena Amaro, mi fiel compañera de escritorio. Muchas gracias por aguantarme cuando he estado agobiado e insoportable, por todas nuestras charlas de camino al hospital y todas las veces que me has ayudado cuando estaba con el agua al cuello. Hemos pasado muchos buenos momentos y me alegro de haber encontrado una amiga como tú. A Marta Selva, digna heredera de las iPS. Eres una gran persona, siempre dispuesta a echar un cable cuando las cosas se tuercen y amenizarnos la mañana poniéndonos al día con tus movidas. Gracias por todo lo que me has ayudado y por descubrirme TikTok. Sé que te irá genial en el transcurso de tu tesis, tienes que mantener vivo el espíritu de RETRACAR. A Marilù Casini, por ser mi compañera de iPS y una de las personas del laboratorio que de verdad entienden lo frustrantes que son, aportando un toque de locura al laboratorio y difundiendo la ciencia como solo ella sabe.

También agradecer a todos los compañeros que se han ido del laboratorio por diferentes circunstancias, a Akaitz Dorronsoro y María Ciria, por todo lo que me han enseñado a nivel personal y profesional, a Estela, por estar ahí en los primeros compases de mi tesis para después encontrarnos de nuevo en la sala de iPS y descargar nuestra frustración, y a Sandra por haberme enseñado a trabajar con las iPS.

En definitiva, muchas gracias por haber convertido ese laboratorio en una segunda casa para mí durante estos cuatro años, no cambiaría la experiencia por nada.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia y especialmente a mis padres todo el apoyo recibido y por confiar en mí durante toda mi etapa universitaria y el desarrollo de mi carrera investigadora. No podría haber llegado hasta aquí sin vosotros.

ÍNDICE

Abreviaturas	9
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	15
1. La cardiotoxicidad inducida por antraciclinas.....	17
1.1 Descubrimiento y tipos de antraciclinas.....	17
1.2 La cardiotoxicidad inducida por antraciclinas en pacientes pediátricos	18
1.3 Detección de la cardiotoxicidad	22
1.3.1 Técnicas de imagen	22
1.3.2 Biomarcadores sanguíneos	23
1.3.3 Variantes genéticas asociadas con la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas.....	24
1.4 Mecanismos de cardiotoxicidad de las antraciclinas.....	25
1.4.1 Estrés oxidativo	25
1.4.2 Daño mitocondrial	27
1.4.3 Daño en el ADN.....	27
1.4.4 Alteración del flujo autofágico.....	28
1.4.5 Alteración del calcio	28
1.4.6 Apoptosis.....	29
1.4.7 Fibrosis.....	30
1.5 Prevención de la cardiotoxicidad	30
2. Las células madre pluripotentes inducidas como modelos de enfermedad cardiovascular	32

2.1 Concepto de célula madre y tipos de células madre	32
2.2 Contexto histórico de las células madre pluripotentes inducidas	34
2.3 Aplicaciones de las células madre pluripotentes inducidas en el ámbito de la biomedicina	38
2.3.1 Uso de las iPSC en la terapia celular	39
2.3.2 Ensayos toxicológicos	40
2.3.3 Modelado de enfermedades empleando iPSC derivadas de pacientes	40
2.3.4 Modelado de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas empleando iPSC	45
3. Los microARNs en la patología cardiovascular	47
3.1 Descubrimiento de los microARNs y origen evolutivo	47
3.2 Biogénesis y función de los miARNs	48
3.3 Los miARNs en la enfermedad cardíaca	50
3.3.1 Papel de los miARNs como biomarcadores en la enfermedad cardíaca	51
3.3.2 Potencial terapéutico de los miARNs en la enfermedad cardíaca	52
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
1. Hipótesis	59
2. Objetivos	59
MATERIAL Y MÉTODOS	61
1. Pacientes	63
2. Declaración ética animal	63

3. Cultivo celular	63
3.1 Medios de cultivo	63
3.2 Células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) .	65
3.3 Diferenciación cardíaca	65
3.4 Cultivos primarios	66
3.4.1 Aislamiento de cardiomiocitos neonatales de rata	66
3.4.2 Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos de rata	67
3.4.3 Cultivo de fibroblastos cardíacos humanos	68
4. Análisis de marcadores cardíacos por citometría de flujo	68
5. Tratamiento con doxorrubicina <i>in vitro</i>	69
6. Inmunofluorescencia en células	69
7. Ensayos de citotoxicidad y apoptosis <i>in vitro</i>	70
7.1 Ensayo de viabilidad celular CCK8	70
7.2 Ensayo de lactato deshidrogenasa	70
7.3 Tinción de anexina-V y DAPI	71
7.4 Actividad caspasa 3/7	71
8. Ensayos de estrés oxidativo <i>in vitro</i>	72
8.1 DCFH-DA	72
8.2 MitoSOX	72
8.3 Glutación reducido	73
9. Estudio del potencial de membrana mitocondrial	73
10. Transfección celular	73
11. Métodos de biología molecular	74

11.1 Extracción de ARN.....	74
11.2 Retrotranscripción de ARN	74
11.3 RT-qPCR de ARN	75
11.4 Extracción de miARN.....	77
11.5 Retrotranscripción de miARN	77
11.6 RT-qPCR de miARN	78
11.7 Extracción de proteína	78
11.8 Cuantificación de proteínas mediante ensayo de BCA	78
11.9 Western Blot.....	79
11.9.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida	79
11.9.2 Transferencia a membrana de PVDF	80
11.9.3 Inmunodetección.....	80
12. Modelado experimental de la cardiotoxicidad inducida por doxorrubicina <i>in vivo</i>	82
12.1 Animales	82
12.2 Tratamiento con doxorrubicina y administración <i>in vivo</i> del miR-4732-3p.....	82
12.3 Ecocardiografía en ratas	83
12.4 Sacrificio de los animales y fijación por perfusión	83
12.5 Histología.....	84
12.5.1 Inclusión en parafina y corte de los corazones	84
12.5.2 Desparafinación del tejido	84
12.5.3 Tricrómico de Masson	85
12.5.4 Rojo sirio	86
12.5.5 Inmunofluorescencia en tejido	86

12.5.6 Cuantificación de la apoptosis por TUNEL	87
12.5.7 Medida del área transversal de los cardiomiocitos mediante tinción con WGA	88
13. Análisis de ontología génica de genes diana del miR-4732-3p	88
14. Análisis de interactoma	88
15. Análisis estadístico.....	89
RESULTADOS	91
1. Selección de pacientes oncológicos pediátricos con cardiotoxicidad inducida por antraciclinas y derivación de hiPSC específicas de paciente	93
2. Diferenciación de las hiPSC a cardiomiocitos	94
3. Caracterización de hiPSC-CM de pacientes pediátricos que experimentaron cardiotoxicidad temprana frente al daño por doxorubicina	97
3.1 Los hiPSC-CM CTX tienen unos mayores niveles de citotoxicidad inducida por doxorubicina y apoptosis que los hiPSC-CM CTRL	97
3.2 Los hiPSC-CM CTX tienen unos niveles superiores de estrés oxidativo comparado con los hiPSC-CM CTRL tras el tratamiento con doxorubicina	100
3.3 Los hiPSC-CM CTX tienen unos mayores niveles de daño genotóxico y mitocondrial que los hiPSC-CM CTRL tras el tratamiento con doxorubicina	102
3.4 Daño sarcomérico causado por la doxorubicina en hiPSC-CM CTRL y CTX.....	104

3.5 Diferencias en la expresión génica entre hiPSC-CM CTRL y CTX tratados con doxorubicina	107
3.6 Diferencias en la expresión de miARNs entre hiPSC-CM CTRL y CTX tratados con doxorubicina	111
4. Estudio de miARNs diferenciamente expresados entre pacientes con cáncer de mama positivas y negativas para la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas	113
5. Estudio del papel cardioprotector del miR-4732-3p <i>in vitro</i>	114
5.1 Efecto del miR-4732-3p frente al daño por doxorubicina en cardiomiocitos neonatales de rata	114
5.2 Efecto del miR-4732-3p frente al daño por doxorubicina en fibroblastos cardíacos de rata	118
6. Estudio del papel cardioprotector del miR-4732-3p <i>in vivo</i>	119
6.1 Expresión del miR-4732-3p en diferentes órganos	119
6.2 Efecto del miR-4732-3p sobre la función cardíaca después del tratamiento con doxorubicina	120
6.3 El miR-4732-3p disminuye el estrés oxidativo y la apoptosis causadas por la doxorubicina en el corazón	121
6.4 Efecto del miR-4732-3p en la vascularización del corazón tras el tratamiento con doxorubicina.....	123
6.5 Efecto del miR-4732-3p en el área transversal de los cardiomiocitos tras el tratamiento con doxorubicina.....	123
6.6 El miR-4732-3p produce una disminución de la fibrosis intersticial causada por la doxorubicina	124

7. Identificación y validación de genes diana del miR-4732-3p	126
8. Efecto de la sobreexpresión del miR-4732-3p sobre la viabilidad de los cardiomiocitos CTRL y CTX tratados con doxorrubicina.....	129
DISCUSIÓN	131
1. Los hiPSC-CM CTX recapitulan la susceptibilidad al daño por doxorrubicina observada en los pacientes pediátricos	133
2. Papel cardioprotector del miR-4732-3p frente al daño inducido por doxorrubicina	141
3. Efecto del miR-4732-3p sobre el daño inducido por doxorrubicina en cardiomiocitos derivados de hiPSC	146
CONCLUSIONES	149
BIBLIOGRAFÍA.....	153

Abreviaturas

3'-UTR	Región no traducida 3'
4-HNE	4-Hidroxinonenal
AAV	Virus adeno-asociado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AGO	Argonauta
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASIC1a	Canal iónico sensor de ácido 1a
AWT	Grosor de la pared anterior
BNP	Péptido Natriurético Cerebral
CAMKII	Quinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo II
CAP	Cambio porcentual de área
cTnI	Troponina cardíaca I
cTnT	Troponina cardíaca T
CTRL1	FiPS CTRL1-SV4F-7
CTRL2	FiPS CTRL2-SV4F-1
CTX1	Ct PBiPS1-SV4F-1
CTX2	Ct PBiPS2-SV4F-1
DCFH-DA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
DOX	doxorubicina
DRZ	Dexrazoxano
ECC	Células embrionarias de carcinoma
EDA	Área de fin de diástole
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ESA	Área de fin de sístole
ESC	Células madre embrionarias
FA	Fracción de acortamiento
FBS	Suero bovino fetal
FDA	Food and Drug Administration
FEVI	Fracción de eyección ventricular izquierda
GO	Ontología génica
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HBSS	Solución tamponada de sales Hank

hiPSC	Células madre pluripotentes inducidas
hiPSC-CM	Cardiomiocitos derivados de hiPSC
HLC	Hepatocyte like cells
HS	Suero de caballo
HSC	Células madre hematopoyéticas
IFM	Intensidad de fluorescencia media
IRE	Elemento de respuesta al hierro
IRP	Proteína de regulación del hierro
LV	Ventrículo izquierdo
MHC	Cadena pesada de la miosina
miARN	microARN
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	NAPDH oxidasa
P/S	Penicilina/estreptomicina
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
PWT	Grosor de la pared posterior
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RyR	Receptor de rianodina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SOD1	Superóxido dismutasa 1
TAC	Constricción de la aorta transversal
TBS	Tampón salino tris
Top2 β	Topoisomerasa-II β
TUNEL	Terminal deoxinucleotidil transferasa
WGA	Aglutinina de germen de trigo

Resumen

Las antraciclinas son fármacos antineoplásicos ampliamente utilizados en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo tanto tumores sólidos como hematológicos. A pesar de su eficacia, su uso se ve limitado por su efecto cardiotoxico. El aumento de los supervivientes de cáncer, especialmente pediátrico, ha provocado que cada vez haya más personas con cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. Por este motivo, es necesaria la búsqueda de nuevos modelos de enfermedad relevantes para comprender la fisiopatología del daño cardíaco inducido por antraciclinas, así como el desarrollo de nuevas terapias cardioprotectoras que permitan el uso de las antraciclinas evitando su efecto cardiotoxico.

En este trabajo se ha estudiado, por una parte, la susceptibilidad al daño por doxorubicina (una de las principales antraciclinas empleadas en clínica) de cardiomiocitos obtenidos a partir de células madre pluripotentes inducidas derivadas de pacientes pediátricos oncológicos que experimentaron cardiotoxicidad causada por antraciclinas. Los cardiomiocitos de los pacientes fueron tratados con doxorubicina y se evaluaron diferentes parámetros, incluyendo la viabilidad, apoptosis, estrés oxidativo, daño genómico, daño mitocondrial, desorganización sarcomérica, etc. comparándolos con cardiomiocitos control. Nuestros resultados mostraron que estos cardiomiocitos recapitulan la susceptibilidad a la doxorubicina observada en los pacientes, constituyendo un buen modelo de enfermedad para estudiar los mecanismos de cardiotoxicidad de la doxorubicina o el cribado de fármacos.

Por otra parte, se ha evaluado el papel cardioprotector de un miARN, el miR-4732-3p, frente al daño inducido por antraciclinas. Este miARN está desregulado en pacientes con cáncer de mama que sufrieron cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. Para comprobar su efecto cardioprotector, este miARN fue sobreexpresado en células cardíacas de rata, las cuales fueron tratadas con doxorubicina, observándose que incrementaba la supervivencia de las células y reducía el estrés oxidativo. También se estudió la cardioprotección *in vivo* en un modelo de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina en rata, observando que mejora la función cardíaca, reduce la fibrosis intersticial y el estrés oxidativo. Además, se hizo un estudio de los posibles genes diana de este miARN. En su conjunto, nuestros resultados muestran que el miR-4732-3p tiene un efecto cardioprotector frente al daño por doxorubicina, y podría ser una herramienta terapéutica para el tratamiento del daño cardíaco causado por las antraciclinas.

Summary

Anthracyclines are drugs widely used in the treatment of several types of cancer, including both solid tumors and hematologic malignancies. Despite its proven efficacy, its use is hampered by its cardiotoxic effect. The increase in cancer survivors, especially pediatric, has led to more and more people with anthracycline-induced cardiotoxicity. Therefore, it is necessary to search for new relevant disease models to better understand the physiopathology of cardiac damage-induced by anthracyclines, as well as the development of new cardioprotective therapies that allow the clinic use of anthracyclines avoiding their cardiotoxic effect.

In this work we have studied, on the one hand, the susceptibility against doxorubicin damage (major anthracycline used in clinic) of cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells derived from oncology pediatric patients that underwent cardiotoxicity-induced by anthracyclines. Cardiomyocytes from these patients were treated with doxorubicin, and we evaluated several parameters, including cell viability, apoptosis, oxidative stress, genomic damage, mitochondrial damage, sarcomere disorganization, etc. comparing the results with control cardiomyocytes. Our results showed that these cardiomyocytes recapitulate the susceptibility against doxorubicin observed in the patients, making them a good disease model to study cardiotoxicity mechanisms of doxorubicin or drug screening.

On the other hand, we evaluated the cardioprotective role of one miRNA, miR-4732-3p, against doxorubicin-induced damage. This miRNA is dysregulated in breast cancer patients that suffered cardiotoxicity-induced by anthracyclines. To test its cardioprotective effect, this miRNA was overexpressed in rat cardiac cells that were treated with doxorubicin, showing an increment of cell survival and a reduction of oxidative stress levels. We also studied *in vivo* cardioprotection in a doxorubicin-induced cardiotoxicity model in rat, showing an improvement in cardiac function, reduced interstitial fibrosis and reduced oxidative stress levels. Moreover, we studied possible target genes of this miARN. Overall, our results showed that miR-4732-3p has a cardioprotective role against doxorubicin-induced damage and could be used as a therapeutic tool for treatment of cardiac damage caused by anthracycline.

Resum

Les antraciclines són fàrmacs antineoplàstics àmpliament utilitzats en el tractament de diversos tipus de càncer, incloent tant tumors sòlids com hematològics. Tot i la seva eficàcia, el seu ús es veu limitat pel seu efecte cardiotòxic. L'augment dels supervivents de càncer, especialment pediàtric, ha provocat que cada cop hi hagi més persones amb cardiotoxicitat induïda per antraciclines. Per aquest motiu, cal cercar nous models de malaltia rellevants per comprendre la fisiopatologia del dany cardíac induït per antraciclines, així com el desenvolupament de noves teràpies cardioprotectors que permetin l'ús de les antraciclines evitant-ne l'efecte cardiotòxic.

En aquest treball s'ha estudiat, d'una banda, la susceptibilitat al dany per doxorubicina (una de les principals antraciclines emprades en clínica) de cardiomiòcits obtinguts a partir de cèl·lules mare pluripotents induïdes derivades de pacients pediàtrics oncològics que van experimentar cardiotoxicitat causada per antraciclines. Els cardiomiòcits dels pacients van ser tractats amb doxorubicina i es van avaluar diferents paràmetres, incloent-hi la viabilitat, apoptosi, estrès oxidatiu, dany genòmic, dany mitocondrial, desorganització sarcomèrica, etc. comparant-los amb cardiomiòcits control. Els nostres resultats van mostrar que aquests cardiomiòcits recapitulen la susceptibilitat a la doxorubicina observada en els pacients, constituint un bon model de malaltia per estudiar els mecanismes de cardiotoxicitat de la doxorubicina o el cribatge de fàrmacs.

D'altra banda, s'ha avaluat el paper cardioprotector d'un miARN, el miR-4732-3p, davant del dany induït per antraciclines. Aquest miARN està desregulat en pacients amb càncer de mama que van patir cardiotoxicitat induïda per antraciclines. Per comprovar el seu efecte cardioprotector, aquest miARN va ser sobreexpressat en cèl·lules cardíques de rata, les quals van ser tractades amb doxorubicina, observant-se que incrementava la supervivència de les cèl·lules i reduïa l'estrès oxidatiu. També es va estudiar la cardioprotecció *in vivo* en un model de cardiotoxicitat induïda per doxorubicina en rata, observant que millora la funció cardíaca, redueix la fibrosi intersticial i l'estrès oxidatiu. A més, es va fer un estudi dels possibles gens diana d'aquest miARN. En conjunt, els nostres resultats mostren que el miR-4732-3p té un efecte cardioprotector davant el dany per doxorubicina, i podria ser una eina terapèutica per al tractament del dany cardíac causat per les antraciclines.

Introducción

1. La cardiotoxicidad inducida por antraciclinas

Las antraciclinas son fármacos antineoplásicos muy efectivos en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, incluyendo leucemias, linfomas, mama, riñón, ovarios, etc. Sin embargo, su uso está limitado debido a los efectos secundarios que generan en los pacientes, siendo el más grave la cardiotoxicidad.

1.1 Descubrimiento y tipos de antraciclinas

Las antraciclinas son producidas en la naturaleza por bacterias del género *Streptomyces*. Las primeras antraciclinas descubiertas fueron las rodomicinas, las cuales tienen un potente efecto antibiótico sobre *Staphylococcus aureus*¹. No obstante, las antraciclinas destacan por su potente efecto anticancerígeno. Las antraciclinas mejor caracterizadas son la daunorrubicina y la doxorubicina. La daunorrubicina fue aislada en 1960 en Italia a partir de bacterias de la especie *Streptomyces peucetius* y se descubrió que poseía efecto antitumoral en ratones^{2,3}. Durante la década de 1960 comenzaron los ensayos clínicos con la daunorrubicina, mostrando que era efectiva en el tratamiento de la leucemia y el linfoma⁴. No obstante, en un estudio sobre el efecto de la daunorrubicina en leucemia pediátrica realizado en 1967 ya se relacionó este fármaco con la cardiotoxicidad en forma de taquicardia y fallo cardíaco⁵.

Más adelante se descubrió que pequeños cambios en la estructura de la daunorrubicina podían producir cambios importantes en la actividad biológica del compuesto resultante. Mediante mutagénesis al azar se modificó una cepa de *S. peucetius* productora de daunorrubicina y se obtuvo una nueva antraciclina llamada adriamicina, la cual pasó a llamarse posteriormente doxorubicina. Esta nueva antraciclina tan solo se diferenciaba con la daunorrubicina en el cambio entre un grupo metilo por un alcohol primario en su cadena, pero demostró tener una actividad antitumoral más potente. No obstante, seguía teniendo como efecto secundario la cardiotoxicidad^{1,4,6}.

Durante las últimas décadas, el potencial antineoplásico de las antraciclinas junto al hecho de que tienen como principal efecto colateral la cardiotoxicidad ha motivado la búsqueda de nuevas antraciclinas que mejoren la actividad antitumoral de la daunorrubicina o la doxorubicina o la tolerancia cardíaca. Aunque se han generado cientos de análogos de la daunorrubicina y la doxorubicina, tan solo han sido aprobadas para uso clínico por la administración de alimentos y medicamentos (FDA, por sus siglas

en inglés) de los Estados Unidos cuatro antraciclinas más: la epirrubicina, la idarrubicina, la mitoxantrona y la valrubicina⁷. En la figura 1 se pueden ver las estructuras químicas de las antraciclinas empleadas en clínica.

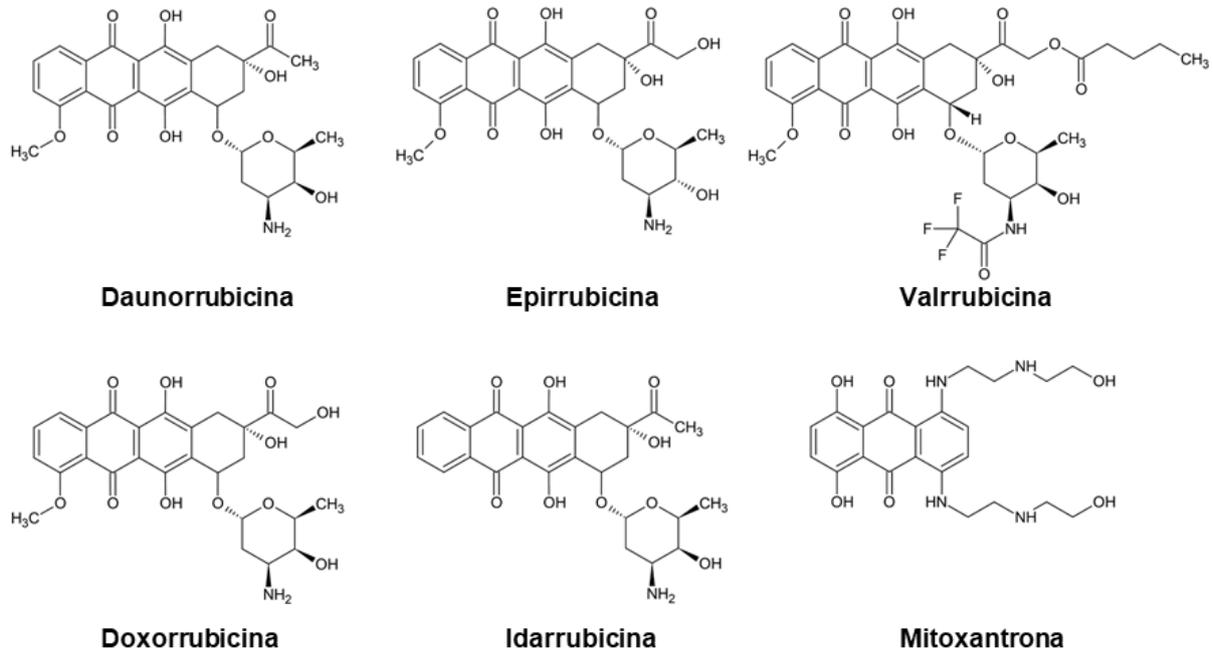


Figura 1. Estructura química de las antraciclinas empleadas en el tratamiento del cáncer.

A pesar de las limitaciones debidas a la cardiotoxicidad y el descubrimiento de nuevas antraciclinas, la daunorubicina y la doxorubicina continúan siendo fármacos de primera línea en el tratamiento de numerosos tipos de cáncer¹, siendo esta última el antraciclina más utilizada de entre todas las aprobadas para uso clínico⁸. Por este motivo, esta tesis se ha centrado en el efecto cardiotoxico de la doxorubicina.

1.2 La cardiotoxicidad inducida por antraciclinas en pacientes pediátricos

El diagnóstico temprano y la mejora de las terapias antineoplásicas han incrementado significativamente el número de supervivientes de cáncer. De hecho, la supervivencia a los 5 años de pacientes oncológicos pediátricos es de aproximadamente el 85% en los países desarrollados⁸⁻¹¹. No obstante, esto ha provocado que cada vez haya más supervivientes de cáncer pediátrico padeciendo los efectos secundarios de los

tratamientos oncológicos, entre los cuales destaca la enfermedad cardíaca, que representa una importante causa de morbilidad y mortalidad¹². La cardiotoxicidad es producida principalmente por el tratamiento con agentes cardiotóxicos como las antraciclinas o el trastuzumab, o por la radioterapia en áreas que involucren al corazón¹³ (Figura 2).

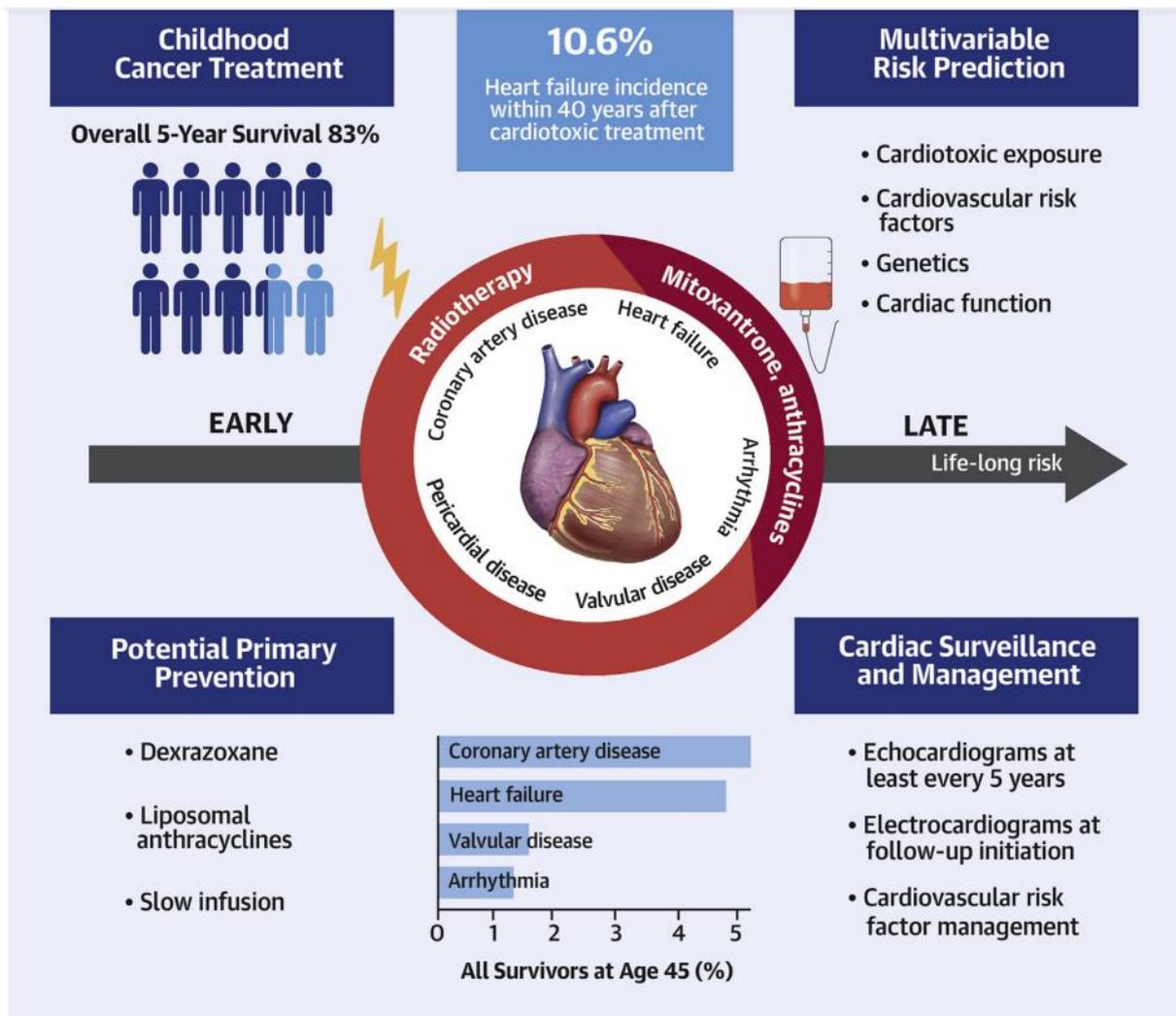


Figura 2. Esquema general de la cardiotoxicidad inducida por los tratamientos antineoplásicos en pacientes pediátricos. Adaptada de Leerink *et al.*¹³

Tanto en pacientes pediátricos como en adultos la disfunción cardíaca es la secuela cardíaca provocada por el tratamiento del cáncer aguda y tardía más descrita. La cardiotoxicidad inducida por antraciclinas puede ir desde una disfunción ventricular izquierda subclínica hasta el fallo cardíaco¹². Esto ha hecho que, a lo largo de los años, se hayan utilizado diferentes definiciones de la disfunción cardíaca inducida por el

tratamiento contra el cáncer¹⁴. No obstante, en 2014 se llegó a un consenso para definir la disfunción cardíaca inducida por el tratamiento contra el cáncer por parte de la Sociedad Americana de Ecocardiografía y de la Sociedad Europea de Imagen Cardiovascular. Esta se definió como una bajada de la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) mayor de 10 puntos porcentuales, hasta llegar a un valor de FEVI menor del 53% (valor de referencia normal para la ecocardiografía de dos dimensiones)^{15,16}. Otras formas de enfermedad cardiovascular atribuibles al tratamiento del cáncer incluyen la enfermedad isquémica, enfermedad de las válvulas cardíacas, enfermedad pericárdica, arritmias, hipertensión, tromboembolismos, enfermedad vascular periférica e hipertensión pulmonar¹⁷.

La cardiotoxicidad inducida por las antraciclinas puede ser aguda o crónica^{18,19}. La cardiotoxicidad aguda se manifiesta durante la primera semana después de recibir la primera dosis de antraciclinas. La cardiotoxicidad crónica se puede subclasificar en temprana, apareciendo los síntomas entre una semana y un año después de comenzar el tratamiento con antraciclinas, o tardía, que se produce a partir de un año de comenzar el tratamiento, pudiendo manifestarse décadas más tarde de la última dosis de antraciclinas.

La cardiotoxicidad aguda en pacientes adultos es de aproximadamente el 11%²⁰. Las manifestaciones incluyen dolor en el pecho debida a la miopericarditis y las arritmias. En los pacientes pediátricos también se han descrito arritmias transitorias en el caso de la cardiotoxicidad aguda, generalmente transitorias y subclínicas. La incidencia de las arritmias es de aproximadamente el 24% en adultos durante las primeras 24 horas de la infusión con doxorubicina, mientras que la prevalencia en niños se desconoce²¹. Otra manifestación de cardiotoxicidad aguda observada en aproximadamente el 50% de los pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda, tratados con dosis moderadas de antraciclinas son las elevaciones de troponina relacionadas con el daño en el miocardio²².

La cardiotoxicidad temprana en pacientes pediátricos está menos documentada. En un estudio llevado a cabo por Getz *et al.* se estudió la incidencia de la cardiotoxicidad en 1022 pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda tratados con elevadas dosis de antraciclinas²³. Se llevó a cabo un seguimiento de los pacientes durante 5 años y, durante ese tiempo, aproximadamente el 12% de los pacientes experimentó enfermedad sistólica ventricular izquierda. Además, más del 70% de los pacientes que experimentó cardiotoxicidad lo hizo durante el tratamiento con antraciclinas.

La prevalencia de la cardiotoxicidad tardía entre los supervivientes de cáncer pediátrico es variable debido a las diferentes definiciones de esta, los métodos de detección, el tipo de cáncer y el diseño de los estudios. No obstante, se estima que la frecuencia de la disfunción cardíaca sintomática es de hasta el 16% de los pacientes expuestos a antraciclinas y en más del 50% hay evidencias ecocardiográficas de alteraciones subclínicas de la capacidad contráctil ventricular izquierda^{24,25}.

El riesgo de la cardiotoxicidad está incrementado en todos los supervivientes de cáncer pediátrico, pero es mucho mayor en aquellos supervivientes que recibieron elevadas dosis de agentes cardiotóxicos, como elevadas dosis de antraciclinas y radioterapia en zonas que afecten al corazón. Aunque ha sido demostrado que el efecto cardiotóxico de la doxorubicina es dosis-dependiente, en el estudio Childhood Cancer Survivor Study se observó que no hay una dosis segura de antraciclinas²⁵. En este estudio se hizo un seguimiento de 14385 supervivientes de cáncer pediátrico durante 5 años y se determinó que el riesgo de desarrollar fallo cardíaco con una dosis de doxorubicina $<250 \text{ mg/m}^2$ era 2,4 veces superior que en pacientes que no recibieron antraciclinas. Este riesgo se incrementa a 5,2 veces para aquellos pacientes que recibieron $\geq 250 \text{ mg/m}^2$ (Figura 3). Otros factores de riesgo para el desarrollo de cardiotoxicidad incluyen el sexo femenino, edad temprana de exposición (< 5 años) y factores de riesgo cardiovascular tradicionalmente relacionados con la edad como la hipertensión, obesidad, dislipemia o diabetes⁹.

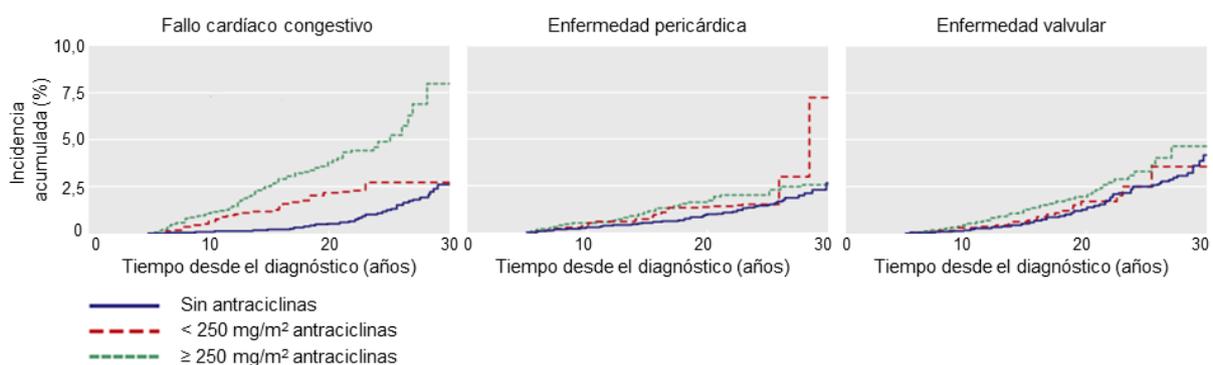


Figura 3. Incidencia acumulada de diferentes enfermedades cardíacas entre supervivientes de cáncer pediátrico en función de la dosis de antraciclinas recibida.

1.3 Detección de la cardiotoxicidad

1.3.1 Técnicas de imagen

En la actualidad, la técnica más comúnmente utilizada para monitorear la función cardíaca en pacientes administrados con antraciclinas es la ecocardiografía 2D. La mayoría de las guías clínicas recomiendan monitorear la función cardíaca antes del tratamiento con antraciclinas, durante este y años después de la última dosis de antraciclinas⁸. La ecocardiografía 2D tiene la ventaja de que no es una técnica invasiva, es ampliamente disponible, económica y no expone a los pacientes a rayos-X o agentes de contraste²⁶. No obstante, es importante destacar que puede haber una gran variabilidad en la obtención e interpretación de las imágenes obtenidas por ecocardiografía, por lo que se requiere personal especializado para su realización²⁷. Además, es posible que no pueda detectar disfunción miocárdica subclínica, perdiendo valor predictivo a la hora de identificar pacientes pediátricos con elevado riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular sintomática en el futuro.

En los últimos años se han desarrollado nuevas modalidades de ecocardiografía para reducir la variabilidad entre los diferentes observadores, como la ecocardiografía 3D. La ecocardiografía 3D permite adquirir mejores imágenes y la implementación de análisis automáticos de estas para evaluar la FEVI y los volúmenes cardíacos²⁸. No obstante, esta modalidad y la habilidad para interpretarla no está tan ampliamente disponible como la modalidad en 2D.

Como alternativa a la ecocardiografía, la resonancia magnética cardíaca (RMC) ha sido utilizada para monitorizar la cardiotoxicidad en pacientes oncológicos pediátricos y supervivientes^{29,30}. La RMC mejora la precisión y reproducibilidad a la hora de evaluar la función cardíaca. Además, mediante el uso de contrastes es capaz de detectar fibrosis miocárdica asociada con el daño en el miocardio, detectar daño subendocárdico y alteraciones de la FEVI subclínicas^{29,30}. Como contrapartida, la RMC no está tan ampliamente disponible como la ecocardiografía y es más cara. No obstante, las ventajas frente a la ecocardiografía convencional pueden convertirla en la técnica de elección para la detección de la cardiotoxicidad en pacientes de alto riesgo en el futuro³¹.

1.3.2 Biomarcadores sanguíneos

Junto con las técnicas de imagen también se utilizan marcadores sanguíneos de daño cardíaco, los cuales puedan predecir o diagnosticar la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. Las troponinas cardíacas T e I (cTnT y cTnI) son dos proteínas que forman parte del complejo proteico necesario para la contracción del músculo cardíaco. Estas proteínas solo se encuentran en los cardiomiocitos, por lo que son empleadas comúnmente como biomarcadores para cualquier evento que produzca daño o muerte de los cardiomiocitos y se utilizan para predecir la mortalidad de pacientes con fallo cardíaco⁸. Las antraciclinas causan daño en los cardiomiocitos y producen liberación de troponinas al torrente sanguíneo. Algunos estudios han demostrado que las concentraciones de troponina en sangre se incrementan de forma aguda en pacientes pediátricos tras recibir antraciclinas y esas elevaciones se correlacionan con una bajada de la FEVI³². No obstante, otros estudios no han encontrado una asociación entre la elevación de troponina en sangre y la disfunción ventricular izquierda en supervivientes de cáncer pediátrico³³.

Otro posible biomarcador de interés es el péptido natriurético cerebral (BNP), ya que este es producido por los ventrículos en respuesta al estrés y se sus niveles sanguíneos se han visto aumentados en pacientes con fallo cardíaco³⁴. El péptido N terminal del BNP (NT-proBNP) también se secreta junto con el BNP y es más interesante como biomarcador al tener una vida media más larga. Los niveles en suero de NT-proBNP han sido relacionados con un aumento en los niveles de troponina y con una fracción de acortamiento reducida tras el tratamiento con antraciclinas²². En otro estudio, se ha visto que en supervivientes de leucemia pediátrica las concentraciones elevadas de NT-proBNP pueden detectar la cardiotoxicidad antes que los cambios ecocardiográficos³⁵.

Aunque las troponinas cardíacas y el BNP han resultado prometedores para detectar la cardiotoxicidad subclínica durante el tratamiento del cáncer, su valor predictivo con relación a la cardiotoxicidad aguda y crónica es limitado. Por este motivo, es necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores que puedan medirse fácilmente en suero. Recientemente se ha descrito el posible uso de miARNs circulantes en suero como nuevos biomarcadores de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas^{36,37}.

1.3.3 Variantes genéticas asociadas con la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas

En los últimos años, muchos estudios llevados a cabo en pacientes pediátricos han identificado variantes genéticas asociadas a la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas (Tabla 1)¹¹. Se han identificado >20 genes con polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), relacionados con daño en el ADN, transporte de fármacos, defensa frente al estrés oxidativo, metabolismo del hierro y función del sarcómero. Por ejemplo, la variante en el gen *RARG* SNP rs2229774 está relacionada con una mayor sensibilidad a la cardiotoxicidad y se cree que es debido a que no reprime la expresión del gen *TOP2B* como la variante silvestre³⁸. Otras variantes conceden resistencia a la cardiotoxicidad, como la variante de *SLC28A3* rs78537585³⁹.

Authors	Year	Cohort (n)	Cases (n)	Controls (n)	Study approach	SNPs	upon ACT
A. DNA damage							
Aminkeng et al.	2015	280	32	248	GWAS	<i>RARG</i> rs2229774	Sensitizing
		96	22	74			
		80	19	61			
B. Anthracycline metabolism and transport							
Visscher et al.	2012	156	38	118	SNP array	<i>SLC28A3</i> rs78537585	Protective
		188	40	148			
		96	43	53			
Visscher et al.	2013	177	46	131	SNP array	<i>SLC28A3</i> rs78537585 <i>UGT1A6</i> rs17863783 <i>SULT2B1</i> rs10426377	Protective Sensitizing Sensitizing
Semsei et al.	2012	234	-	-	Candidate gene approach	<i>ABCC1</i> rs3743527, rs246221, rs3743527	Sensitizing
Armenian et al.	2013	255	77	178	SNP array	<i>ABCC2</i> rs8187710 <i>RAC2</i> rs1305833** <i>HFE</i> rs1799945**	Sensitizing Sensitizing Sensitizing
C. Oxidative stress capacity							
Krajinovic et al.	2016	251	-	-	GWAS	<i>ABCC5</i> rs7627754 <i>NOS3</i> rs1799983	Sensitizing Protective
Blanco et al.	2012	487	170	317	Candidate gene approach	<i>CBR3</i> rs1056892	Sensitizing
Ruiz-Pinto et al.	2017	93	58	35	SNP array	<i>GPR35</i> rs12468485	Sensitizing
Wang et al.	2014	287	93	194	SNP array	<i>HAS3</i> rs2232228	Sensitizing
Windsor et al.	2012	58	41	17	Candidate gene approach	<i>GSTP1</i> rs1695	Sensitizing
Rajić et al.	2009	76	43	33	Candidate gene approach	<i>CAT</i> rs10836235	Protective
Hildebrandt et al.	2017	108	46	62	Candidate gene approach	<i>PLCE1</i> rs932764 <i>ATP2B1</i> rs17249754	Protective Protective
D. Impaired iron metabolism							
Lipshultz et al.	2013	184	-	-	Candidate gene approach	<i>HFE</i> rs1800562	Sensitizing
E. Sarcomere dysfunction							
Wang et al.	2016	331	112	219	GWAS	<i>CELF4</i> rs1786814	Sensitizing
		54	54	0			

Tabla 1. Estudios que han identificado variantes genéticas asociadas con la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas en pacientes pediátricos clasificados por el mecanismo de cardiotoxicidad con el que podrían estar relacionados. Adaptado de Mancilla et al.¹¹

La sensibilidad a la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas es un proceso fisiopatológico complejo. Hay muchos factores diferentes que pueden influir en el eventual desarrollo de una enfermedad cardiovascular, incluyendo la dosis de antraciclinas suministrada, su uso junto con otros agentes cardiotoxicos, la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular o la predisposición genética. Por este motivo, es necesario el uso de algoritmos multifactoriales para evaluar cada caso de forma personalizada y poder tomar decisiones clínicas al respecto en lo relativo a la dosis de antraciclinas o el posible uso de agentes cardioprotectores.

1.4 Mecanismos de cardiotoxicidad de las antraciclinas

Los mecanismos mediante los cuales las antraciclinas producen cardiotoxicidad no se conocen completamente. La antraciclina más estudiada en lo que respecta a los mecanismos de cardiotoxicidad es la doxorubicina y algunos de los más estudiados son la generación de especies reactivas de oxígeno, la apoptosis, el daño genotóxico o el daño mitocondrial.

1.4.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es el mecanismo más estudiado de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. Este se produce cuando hay un desequilibrio entre la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y el nitrógeno (RNS) y los mecanismos antioxidantes, los cuales existen a niveles relativamente bajos en el corazón comparado con otros órganos⁴⁰. Durante los últimos 30 años se han postulado diferentes mecanismos moleculares para la generación de especies reactivas y su efecto dañino en el miocardio. A continuación, se describen algunos de esos mecanismos.

Producción de ROS dependiente de NOS

Las óxido nítrico sintasas (NOS) son enzimas que producen óxido nítrico (NO), mediante la oxidación de L-arginina. Hay tres isoformas distintas de NOS: la NOS neuronal (nNOS) y la NOS endotelial (eNOS), ambas expresadas constitutivamente; y la NOS inducible, llamada iNOS⁴¹. Se ha visto que la doxorubicina puede unirse a la eNOS reductasa e inducir la formación del radical DOX-semiquinona, que se reduce para producir superóxido. Esta unión produce un desequilibrio, disminuyendo los niveles de NO y aumentando los de superóxido, produciendo cardiotoxicidad⁴². Por otra

parte, también se ha comprobado que la doxorubicina aumenta la expresión de la iNOS e induce la formación de nitrotirosina, un reactivo que aumenta la producción de superóxido mitocondrial⁴³.

Producción de ROS dependiente de NADPH

Las NADPH oxidasas (NOX) son enzimas que producen superóxido y, de manera secundaria, también producen otras ROS como el peróxido de hidrógeno⁴⁴. Se ha visto que las NOX son utilizadas como fuente de generación de ROS en el corazón⁴⁵. Las NOX producen el radical DOX-semiquinona al catalizar la transferencia de un electrón desde el NADPH a la doxorubicina, de manera similar a la vía de generación de ROS mediante NOS. Estos ROS generados por la interacción entre la NOX y la doxorubicina contribuyen de manera significativa al remodelado cardíaco y alteran la contractibilidad del corazón.

Producción de ROS dependiente de hierro

La doxorubicina tiene afinidad con el hierro y es capaz de formar complejos DOX-Fe. Los complejos DOX-Fe interactúan con los radicales libres de oxígeno y promueven la generación de más ROS⁴⁶. No obstante, nuevos estudios parecen indicar que los complejos DOX-Fe tienen un impacto menor en la producción de ROS, siendo más perjudicial la acumulación de Fe en los cardiomiocitos⁴⁷. La homeostasis del hierro celular es regulada por los elementos de respuesta al hierro (IREs) y las proteínas reguladoras de hierro (IRPs). Los IRPs se unen a los IREs localizados en los ARNm que codifican las proteínas involucradas en la captación, acumulación y exportación de hierro⁴⁰. Cuando los niveles intracelulares de hierro son altos, se forman complejos [4Fe-4S] que activan la aconitasa, la cual se une a los IRPs e impide su unión a los IREs. Cuando la doxorubicina o su metabolito el doxorubicinol unen hierro, lo retiran de los complejos [4Fe-4S], estabilizando el ARNm que codifica la proteína de captación de hierro, la transferrina, y evitan la traducción de la proteína de unión de hierro, la ferritina, alterando el metabolismo del hierro al promover su acumulación intracelular⁴⁸.

Peroxidación de lípidos

Los ROS producidos por la doxorubicina inducen la peroxidación de lípidos en los cardiomiocitos⁴⁹. Tanto *in vitro* como *in vivo* se puede observar que la doxorubicina produce un aumento de los productos secundarios de la peroxidación de lípidos, el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal (4-HNE). Los grupos peroxilo producidos en los

fosfolípidos de la membrana son muy reactivos, iniciando una cascada de eventos oxidativos en fosfolípidos adyacentes que se auto propaga al generar nuevos grupos peroxilo. Si los sistemas de defensa frente al estrés oxidativo de la célula no son capaces de detener el proceso, la peroxidación de fosfolípidos continua y daña seriamente la célula llevando a la muerte celular⁵⁰.

1.4.2 Daño mitocondrial

La mitocondria juega un papel fundamental en los procesos de apoptosis, necrosis y autofagia, y representa una de las principales dianas de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. La doxorubicina aumenta los niveles de estrés oxidativo en las mitocondrias⁴⁰. La doxorubicina es una molécula catiónica y, dentro de las mitocondrias, se une de manera irreversible al fosfolípido aniónico cardiolipina. La cardiolipina participa en la cadena de transporte electrónico y también tiene un papel importante en la apoptosis. La unión entre la doxorubicina y la cardiolipina produce su peroxidación, lo que lleva a la liberación del citocromo C de la mitocondria, induciendo apoptosis dependiente de caspasas, desacopla la cadena de transporte electrónico y produce la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial⁵¹.

La doxorubicina también altera el metabolismo de las mitocondrias. Se ha visto que la doxorubicina disminuye la oxidación de ácidos grasos e incrementando el metabolismo de la glucosa, produciendo un cambio entre el metabolismo aerobio a un metabolismo anaerobio⁵². Por último, se ha visto que la doxorubicina altera la biogénesis de las mitocondrias y la mitofagia⁵³.

1.4.3 Daño en el ADN

Otro de los mecanismos de cardiotoxicidad de la doxorubicina se basa en su interacción con la topoisomerasa-II β (Top2 β). Esta enzima participa en los cambios topológicos del ADN durante la transcripción genética, es particularmente abundante en los cardiomiocitos y se expresa de forma constitutiva⁵⁴. La doxorubicina se une a la Top2 β y forma un complejo ternario DOX-Top2 β -ADN que induce roturas de doble cadena en el ADN, produciendo la muerte de los cardiomiocitos⁵⁵. En 2012, para estudiar el papel de la Top2 β en la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas Zhang *et al.* utilizaron una cepa de ratones que no expresaba Top2 β en el corazón⁵⁶. El *knock-*

out de Top2 β en los ratones proporcionó resistencia a la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina.

1.4.4 Alteración del flujo autofágico

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado que está involucrado en el mantenimiento de la homeostasis celular y la supervivencia bajo condiciones normales y de estrés. Involucra la eliminación de proteínas y orgánulos dañados para evitar el daño celular y promover la supervivencia de las células. Es un proceso protector y su función está altamente regulada para responder correctamente a los diferentes estímulos⁵⁷. Se ha visto que la autofagia esta desregulada en diferentes procesos, incluyendo cardiopatía isquémica y fallo cardíaco^{58,59}. Se ha visto que la doxorubicina altera la expresión de diversos genes relacionados con la autofagia. En un estudio llevado a cabo por Li *et al.* se observó que la doxorubicina produce un bloqueo del flujo autofágico tanto *in vivo* como *in vitro*. Este boqueo produce un incremento de autolisosomas parcialmente degradados, produciendo cardiotoxicidad⁶⁰.

1.4.5 Alteración del calcio

La doxorubicina produce un incremento de los niveles de calcio intracelular, lo que produce un aumento de ROS e induce apoptosis en los cardiomiocitos. Esto se debe a que durante el metabolismo de la doxorubicina se produce el metabolito doxorubicinol, el cual induce a la quinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo II (CaMKII), lo que origina una salida de calcio del retículo sarcoplásmico al citoplasma de los cardiomiocitos. El aumento del calcio intracelular produce la desorganización de los sarcómeros, afectando a la capacidad contráctil de los cardiomiocitos, e induce necrosis y apoptosis mediada por calpaínas/caspasa-12⁶¹. También se ha visto que la doxorubicina produce la regulación a la baja de varios genes involucrados en la homeostasis del calcio, como la Ca²⁺ ATPasa, el receptor de rianodina 2 (RyR), el fosfolambano o la calsecuestrina⁶².

1.4.6 Apoptosis

La apoptosis es una forma de muerte celular programada que se puede producir de manera fisiológica, pero también patológica en respuesta a diferentes tipos de estrés⁶³. Como ya se ha comentado, la doxorubicina puede activar la vía intrínseca de la apoptosis de diferentes maneras, incluyendo la generación de radicales libres, la generación de rupturas de doble cadena en el ADN, el daño en las mitocondrias, la alteración del flujo autofágico o la desregulación del calcio. Además, se ha visto que la doxorubicina puede regular a la baja la vía de señalización de supervivencia de Akt, lo cual induce la activación de la caspasa-3, produciendo apoptosis⁶⁴.

Por otra parte, se ha demostrado que la doxorubicina puede inducir la expresión tanto de los ARNs como de las proteínas de diferentes receptores de muerte, como TNFR1, Fas, DR4 o DR5, incrementando la apoptosis de los cardiomiocitos por la vía extrínseca⁶⁵.

En la figura 4 se puede ver un resumen de las diferentes vías por las cuales la doxorubicina produce cardiotoxicidad en los cardiomiocitos.

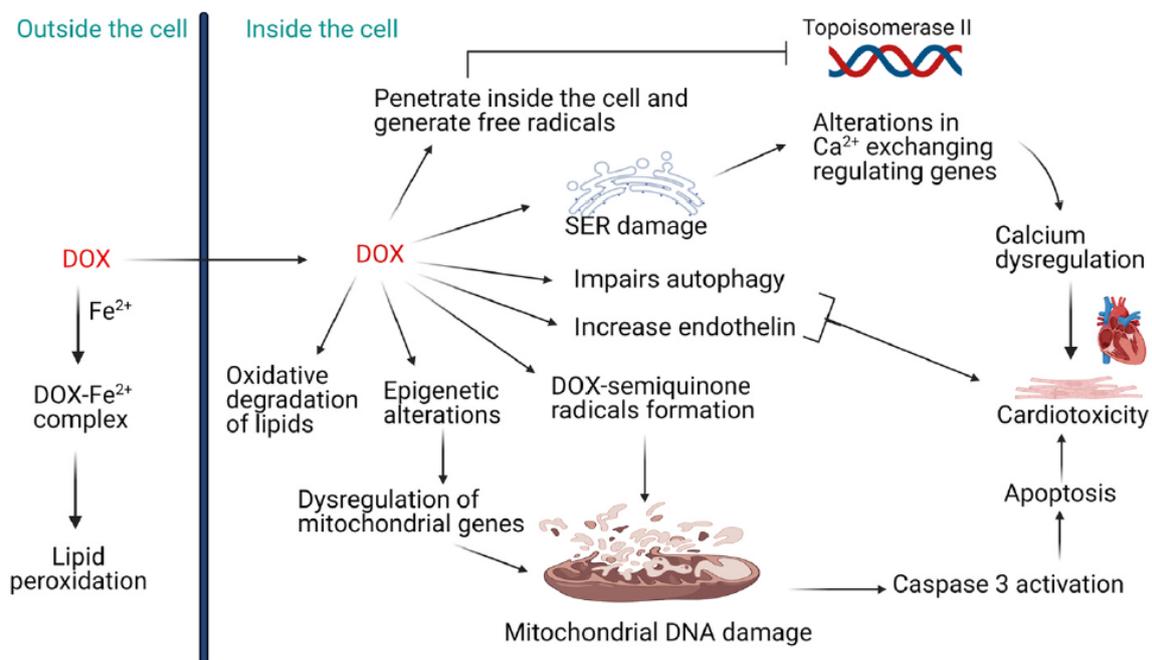


Figura 4. Diferentes mecanismos de acción de la doxorubicina para inducir cardiotoxicidad en los cardiomiocitos. Adaptada de Chakraborty *et al.*⁶⁶

1.4.7 Fibrosis

El tratamiento con doxorubicina promueve la senescencia celular e induce la diferenciación de los fibroblastos cardíacos a miofibroblastos, los cuales tienen un fenotipo pro-fibrótico⁶⁷. En la cardiomiopatía inducida por doxorubicina, se ha podido observar fibrosis intersticial y perivascular⁶⁸. La fibrosis cardíaca mediada por doxorubicina se produce como una consecuencia a la necrosis/apoptosis celular, y a una respuesta patológica a la producción de ROS⁶⁹. También se ha visto que la doxorubicina activa las metaloproteinasas (MMP) MMP-2 y MMP-9, que favorecen la formación de colágeno y, por tanto, la fibrosis miocárdica^{70,71}. Estas MMPs también activan la vía de TGF- β y p-SMAD3, incrementando todavía más la deposición de colágeno⁷².

1.5 Prevención de la cardiotoxicidad

Las estrategias para prevenir la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas se basan en la mejora de los tratamientos oncológicos para disminuir la exposición a antraciclinas u otros tratamientos cardiotóxicos, el desarrollo de nuevas formulaciones de antraciclinas con un menor impacto en la salud cardiovascular, y el desarrollo de fármacos cardioprotectores.

La encapsulación de la doxorubicina en liposomas es una de las principales estrategias para intentar disminuir su cardiotoxicidad, al mismo tiempo que se mejora la llegada del fármaco al tumor. Las nanopartículas de doxorubicina liposomal pegiladas (Doxyl) son un sistema que encapsula la doxorubicina en liposomas con una cubierta de polietilenglicol, aunque uno de los principales inconvenientes es la posible disminución de la eficacia terapéutica a la hora de tratar el cáncer⁷³. La doxorubicina liposomal pegilada ha sido utilizada desde el 2014 para el tratamiento del cáncer de mama y el cáncer de ovario en pacientes adultas y se ha visto que reduce significativamente la cardiotoxicidad de la doxorubicina convencional⁷⁴. No obstante, la dosis acumulada de doxorubicina continúa siendo una preocupación clínica. En la actualidad su uso está aprobado para el tratamiento del cáncer de ovario en pacientes con tumores avanzados, refractarios y recurrentes siempre y cuando no haya elevado riesgo de cardiotoxicidad. Por otra parte, hay pocos estudios sobre el uso de doxorubicina liposomal en pacientes pediátricos⁷⁵.

En cuanto al uso de agentes cardioprotectores, en los últimos años se han probado diferentes estrategias basadas en combatir los efectos perjudiciales de la doxorubicina, como por ejemplo el uso de agentes antioxidantes como la acetilcisteína, la coenzima Q10 o el carvedilol, pero ninguno de ellos ha sido claramente eficaz y, actualmente, ninguno de ellos se utiliza en la práctica clínica⁸. El único agente cardioprotector utilizado actualmente en clínica es el dexrazoxano. El dexrazoxano es un quelante de hierro, capaz de evitar la formación de complejos DOX-Fe⁷⁶. No obstante, nuevas investigaciones han mostrado que el dexrazoxano también puede inhibir la interacción entre la topoisomerasa-II β y la doxorubicina, limitando así el estrés genotóxico⁷⁷. Se ha comprobado que un análogo del dexrazoxano capaz de unir hierro, pero no interactuar con la Top2 β , carecía del efecto cardioprotector en un modelo de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina en rata, indicando que este sería el mecanismo cardioprotector del dexrazoxano⁷⁸. El uso del dexrazoxano está aprobado por la Agencia Europea del Medicamento y la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. para pacientes adultos recibiendo dosis de doxorubicina superiores a 300 mg/m²⁷⁹. En cuanto a su uso en pacientes pediátricos, la Agencia Europea del Medicamento aprueba el uso de dexrazoxano en aquellos pacientes que reciban dosis acumuladas de doxorubicina superiores a 300 mg/m²⁸⁰. Además, en un trabajo reciente se ha reevaluado la evidencia disponible sobre el uso de dexrazoxano en pacientes pediátricos recibiendo antraciclinas y se ha llegado a la conclusión de que, dado el riesgo dosis-dependiente de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas, los beneficios del uso de dexrazoxano superan los riesgos de posibles neoplasias cuando la dosis de doxorubicina es igual o superior a 250 mg/m², pero no hay evidencia suficiente de que ese sea el caso con dosis inferiores de doxorubicina⁸¹. A pesar de los efectos beneficiosos del dexrazoxano, hoy en día sigue siendo necesaria la búsqueda de nuevas estrategias que disminuyan la cardiotoxicidad de las antraciclinas sin limitar su potencial terapéutico frente al cáncer, ya que las opciones terapéuticas en clínica son limitadas.

En la figura 5 se muestran los diferentes mecanismos por los que la doxorubicina afecta al metabolismo celular y la actividad cardioprotectora del dexrazoxano.

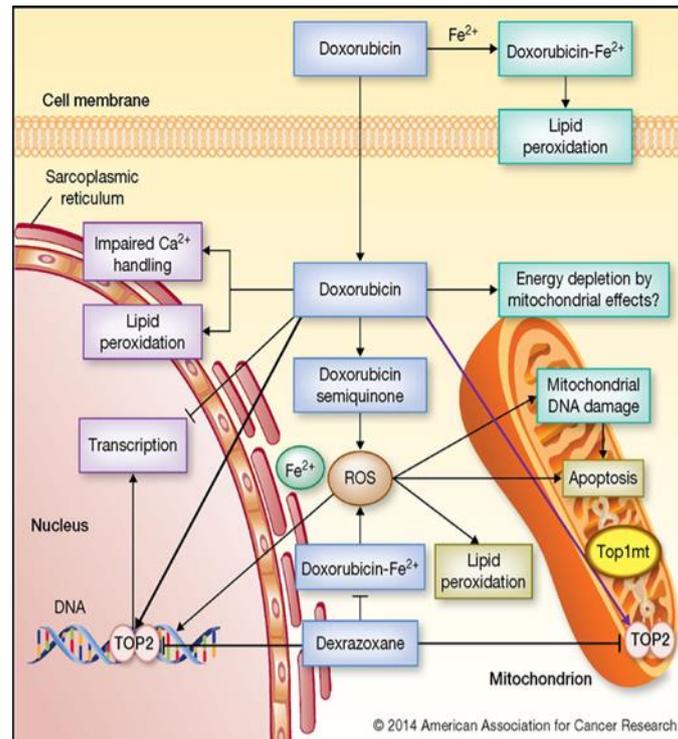


Figura 5. Efecto de la doxorubicina sobre el metabolismo celular y mecanismos de cardioprotección del dexrazoxano. Adaptada de Nitiss *et al.*⁸²

2. Las células madre pluripotentes inducidas como modelos de enfermedad cardiovascular

2.1 Concepto de célula madre y tipos de células madre

Las células madre o células troncales (por su traducción del inglés *stem cells*) son células que se caracterizan por dos propiedades: la capacidad de auto-renovarse y la habilidad de diferenciarse a otros tipos celulares especializados⁸³. Es decir, las células madre, después de dividirse, puede mantener sus propiedades como célula madre o entrar en un programa de diferenciación para dar lugar a nuevas células diferenciadas y especializadas. Durante el desarrollo embrionario, las células madre son capaces de formar células de todas las capas germinales, como el mesodermo, endodermo y ectodermo, mientras que en los organismos adultos las células madre participan en procesos de reparación frente a daños y en la renovación de órganos con mucho recambio celular como la sangre, la piel o el intestino⁸⁴.

Las células madre se pueden clasificar basándose en su potencial o capacidad de diferenciación en cuatro categorías^{84,85} (Figura 6):

- Células madre totipotentes: son células capaces de diferenciarse a todos los tejidos embrionarios y también los extraembrionarios. Son células capaces por tanto de dar lugar a un organismo completo. Solo el cigoto y las células obtenidas tras sus primeras divisiones (los blastómeros) tienen este potencial.
- Células madre pluripotentes: estas células se pueden diferenciar a células de las tres capas germinales, pero no pueden producir tejidos extraembrionarios. Se incluyen las células de la masa celular interna de los blastocistos (a partir de las cuales se obtienen las células madre embrionarias o ESCs) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).
- Células madre multipotentes: son células madre presentes en los tejidos adultos y pueden dar lugar a diferentes tipos celulares dentro de un linaje específico. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (HSC), las cuales pueden diferenciarse a los diferentes tipos celulares sanguíneos, o las células madre mesenquimales, que pueden diferenciarse a osteocitos, condrocitos y adipocitos, entre otros tipos celulares.
- Células madre unipotentes: son células madre que únicamente son capaces de diferenciarse a un tipo celular. Por ejemplo, las espermatogonias, que se diferencian para dar lugar a los espermatozoides, o las células satélite del músculo esquelético.

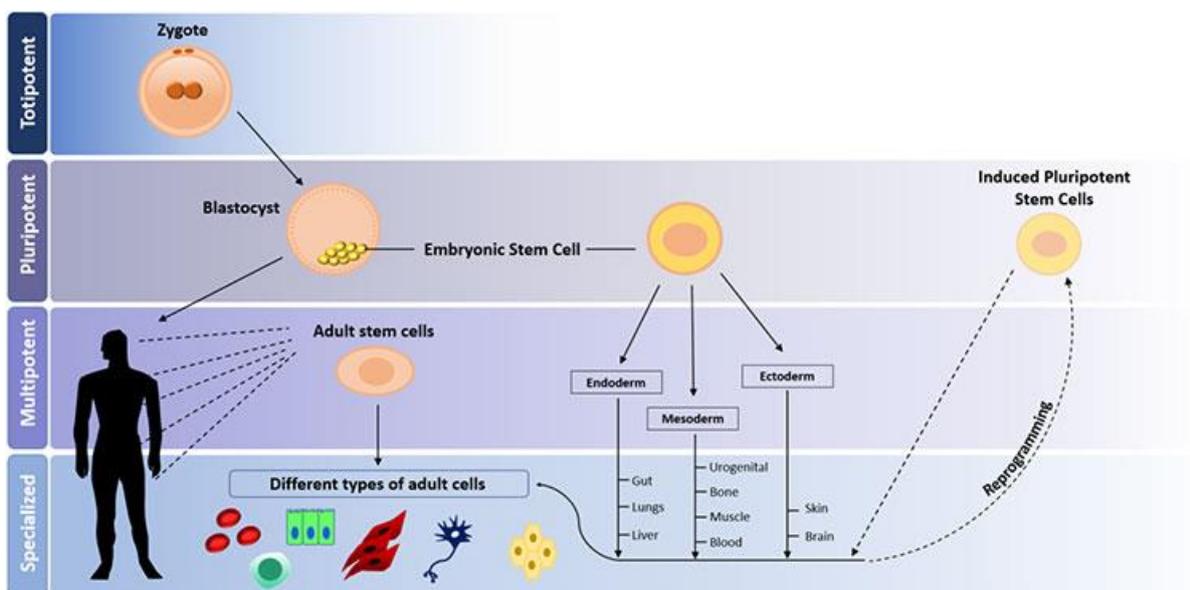


Figura 6. Diferentes niveles de potencial de las células madre. Adaptada de <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2021/july/stem-cells-biomarkers/>.

2.2 Contexto histórico de las células madre pluripotentes inducidas

La creación de las células madre pluripotentes ha sido posible gracias a una serie de observaciones y al desarrollo tecnológico que se produjo a lo largo de seis décadas. Estos son: i) la demostración de que las células ya diferenciadas tienen la misma información genética que las células embrionarias gracias a los experimentos de transferencia nuclear; ii) el desarrollo de técnicas que permitieron obtener y cultivar líneas celulares pluripotentes; iii) y la observación de que los factores de transcripción son componentes clave en la determinación del destino celular y su expresión forzada permite cambiar de un tipo celular maduro a otro (lo que se conoce como transdiferenciación).

Transferencia nuclear y clonación

Durante la década de 1950, Briggs y King desarrollaron la técnica de transferencia nuclear de células somáticas utilizando como modelo ranas de la especie *Xenopus laevis*, ya que los oocitos de estas ranas son muy grandes (1 mm de diámetro) por lo que eran más fáciles de manipular y estudiar. Gracias a los experimentos de transferencia nuclear se estudió el potencial de núcleos aislados de embriones y renacuajos que fueron trasplantados a oocitos enucleados. Estos trabajos mostraron que las células diferenciadas de los anfibios retenían la información genética necesaria para permitir la generación de una rana clonada^{86,87}. La conclusión de estos experimentos junto con nuevos descubrimientos fue que el desarrollo produce cambios epigenéticos reversibles en las células en lugar de cambios genéticos en el genoma durante el proceso de diferenciación celular. La culminación de estos experimentos se llevó a cabo gracias a la clonación del primer mamífero, la oveja Dolly, por parte de Wilmut y su equipo en 1997⁸⁸. En este trabajo, aparte de utilizar células embrionarias, también utilizaron células adultas, cuyos núcleos fueron utilizados para la transferencia nuclear y la clonación de ovejas, mostrando que incluso el genoma de células completamente especializadas es, a nivel genético, totipotente, siendo capaz de dar lugar a un organismo entero.

Células pluripotentes y formación de híbridos

Otro gran avance hacia el desarrollo de las iPSC fue el establecimiento de líneas celulares pluripotentes inmortales a partir de teratocarcinomas. Estas células se denominaron células embrionales de carcinoma (ECC)^{89,90} y se descubrió que podían

cultivarse y mantener su pluripotencia⁹¹. En un estudio publicado por Miller y Ruddle en 1976 se descubrió que las ECCs se podían fusionar con células somáticas y que los híbridos resultantes adquirirían las propiedades pluripotentes de las ECCs, mientras que perdían las características de célula somática⁹². La dominancia del estado pluripotente sobre el somático en las células híbridas llevo a plantear la existencia de factores en las ECCs que conferirían el estado pluripotente.

Las ECCs se pueden derivar de teratocarcinomas inducidos al trasplantar embriones tempranos de ratón en lugares histocompatibles. Esto llevó a tratar de aislar células pluripotentes de dichos embriones. A partir de células de la masa celular interna de blastocistos de ratón se lograron aislar las primeras células madre embrionarias de ratón⁹³ y, más adelante, se aislaron células madre embrionarias de humano (hESC)⁹⁴.

La obtención de la primera línea de hESC en 1998 desató uno de los mayores debates éticos en la historia de la investigación: el estatus moral del embrión humano del que se derivan las hESCs, ya que para obtenerlas es necesario destruir embriones humanos viables de 5 días pre-implantacionales. Los detractores del uso de hESC argumentan que, como el embrión es capaz de desarrollarse en un ser humano, no es ética su destrucción para obtener las hESC. Hay quien considera que dichos embriones no poseen estatus moral en absoluto, mientras que otros consideran que su limitado estatus moral es claramente sobrepasado por los potenciales beneficios que se podrían obtener de la investigación con hESC⁹⁵.

Factores de transcripción y cambios de linaje celular

Los factores de transcripción asociados a un linaje celular específico ayudan a establecer y mantener la identidad celular durante el desarrollo al expresar genes específicos de linaje celular y reprimir la expresión de genes de otros tipos celulares⁹⁶. El tercer principio que contribuyó al descubrimiento de las células pluripotentes inducidas fue el hecho de que se puede cambiar el destino de un tipo celular concreto al expresar ectópicamente factores de transcripción de otro tipo celular. La primera demostración de este principio fue la formación de miofibras musculares a partir de fibroblastos transducidos con vectores retrovirales expresando el factor de transcripción de músculo esquelético MyoD⁹⁷. En años posteriores se realizaron otras transdiferencias, como la conversión de fibroblastos en cardiomiocitos o incluso en neuronas, mostrando que las conversiones no estaban restringidas al mismo linaje o capa germinal^{98,99}. Estos experimentos crearon el marco intelectual necesario para la

búsqueda sistemática de factores de transcripción que pudieran inducir la conversión de células diferenciadas a células pluripotentes.

Descubrimiento de las iPSC

Las primeras iPSC fueron generadas por Yamanaka y Takahashi en 2006¹⁰⁰. En su estudio, utilizaron fibroblastos adultos de ratón modificados para expresar un gen de resistencia bajo el *locus* de *Fbxo15*, un gen específico de ESC. Para identificar los factores transcripcionales capaces de reprogramar las células adultas a células pluripotentes sobreexpresaron, mediante vectores retrovirales, un conjunto de 24 factores asociados a la pluripotencia que pudieran activar el gen de resistencia. La combinación de factores permitió la activación de *Fbxo15* y la formación de colonias resistentes con morfología similar a las ESC. Mediante rondas sucesivas de eliminación de factores individuales se logró identificar la combinación mínima de factores que podían inducir la pluripotencia, llamados posteriormente los factores de Yamanaka: *Klf4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Oct4*. Estas iPSC generadas mediante la selección por *Fbxo15* expresaban en su superficie marcadores de pluripotencia como SSEA-1 y Nanog, eran capaces de generar teratomas en ratones y contribuían a la formación del embrión tras su inyección en blastocistos. En 2007 se produjeron las primeras hiPSC a partir de fibroblastos adultos humanos¹⁰¹.

El descubrimiento de las hiPSC ha sido uno de los mayores avances en el campo de la biología y la medicina, ya que estas células, al contrario que las ESC, no tienen el problema ético asociado a la destrucción de embriones, permitiendo su uso para la investigación básica y traslacional con menos restricciones. Además, el hecho de que se puedan derivar hiPSC específicas de pacientes favorece su uso tanto para terapia celular, ya que se pueden realizar trasplantes autólogos, como para la investigación de enfermedades específicas del paciente y cribado de fármacos.

Métodos de generación de iPS

Las primeras iPSC generadas empleaban vectores retrovirales que se integraban de forma estable en el genoma de las células para inducir la expresión de *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2*^{100,102}. Los transgenes retrovirales generalmente se silencian hacia el final de la reprogramación¹⁰³, pero este proceso era incompleto y acaba produciendo células parcialmente reprogramadas que continúan necesitando la expresión de los factores exógenos y no activaban la expresión de los genes endógenos^{100,104}. Además, la reactivación de los transgenes virales en las iPSC puede afectar a su potencial de

diferenciación y en muchas ocasiones lleva a la formación de tumores en quimeras animales^{100,102}. Este problema es mucho mayor cuando se emplean vectores lentivirales que expresan los factores de reprogramación de forma constitutiva¹⁰⁵.

Se han llevado a cabo diferentes aproximaciones para obtener iPSC libres de transgenes para evitar los posibles efectos perjudiciales derivados de la expresión descontrolada de los transgenes y la mutagénesis insercional. Esto es particularmente importante cuando se consideran las iPSC para su uso en clínica. Una de las formas de obtener iPSC sin integración de transgenes consiste en utilizar vectores que no se integran en el genoma de las células hospedadoras. Las primeras iPSC libres de integración se obtuvieron a partir de hepatocitos de ratón empleando vectores adenovirales no integrativos¹⁰³. Además, se han obtenido iPSC sin usar virus a partir de fibroblastos embrionarios de ratón usando plásmidos¹⁰⁶. También se han reprogramado fibroblastos humanos de forma no integrativa empleando el virus Sendai, ya que este virus permanece en el citoplasma tras la infección, tiene una elevada tasa de transducción y reprogramación y sus copias se diluyen tras múltiples pases, obteniendo iPSC libres de virus^{107,108}. La eficiencia de la reprogramación empleando métodos no integrativos es mucho menor que la conseguida con vectores integrativos, pero evitan la integración de los transgenes en el genoma de las iPSC y por ello son preferidos para su uso en investigación y en la clínica.

Otros sistemas no integrativos que aumentan la seguridad de las iPSC utilizan sistemas no virales para su obtención. Entre ellos, están los sistemas basados en el ADN, como el uso de vectores circulares expresando los factores de Yamanaka^{109,110}. Aunque las técnicas más comunes de reprogramación están basadas en el ADN y estas consiguen la reprogramación efectiva y eficiente de las células somáticas, son consideradas menos seguras, ya que incluso en los sistemas no integrativos los fragmentos del ADN empleados en la reprogramación pueden terminar por insertarse en el genoma¹¹¹. Por este motivo, algunos grupos se han centrado en la búsqueda de métodos de reprogramación que no emplean ADN basados en el uso de ARNm^{112,113}, miARN¹¹⁴, proteínas recombinantes¹¹⁵ o incluso moléculas químicas pequeñas^{116,117}. En la figura 7 se muestran las principales ventajas y desventajas de los diferentes métodos de obtención de iPSC.

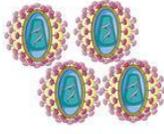
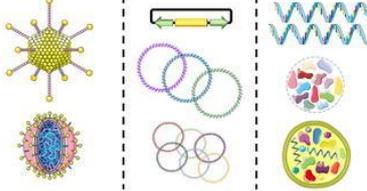
	Integrating	Non-Integrating
Method		
Safety		
Efficiency		
Applications		

Figura 7. Principales ventajas y desventajas de los métodos de reprogramación de células somáticas integrativos y no integrativos. Adaptado de Belviso *et al.*¹¹¹

2.3 Aplicaciones de las células madre pluripotentes inducidas en el ámbito de la biomedicina

Como ya se ha comentado, las iPSC poseen importantes ventajas para su aplicación médica, ya que pueden ser derivadas directamente de los pacientes. Las iPSC y las células derivadas de estas poseen el mismo genoma que del paciente del que se obtuvieron, proporcionando células somáticas específicas de pacientes que no podrían ser obtenidas de otra manera. Estas células poseen por tanto un gran potencial para el modelado de enfermedades, el descubrimiento de nuevos fármacos, ensayos toxicológicos y también para un posible uso terapéutico en el contexto de la terapia celular¹¹⁸ (Figura 8).

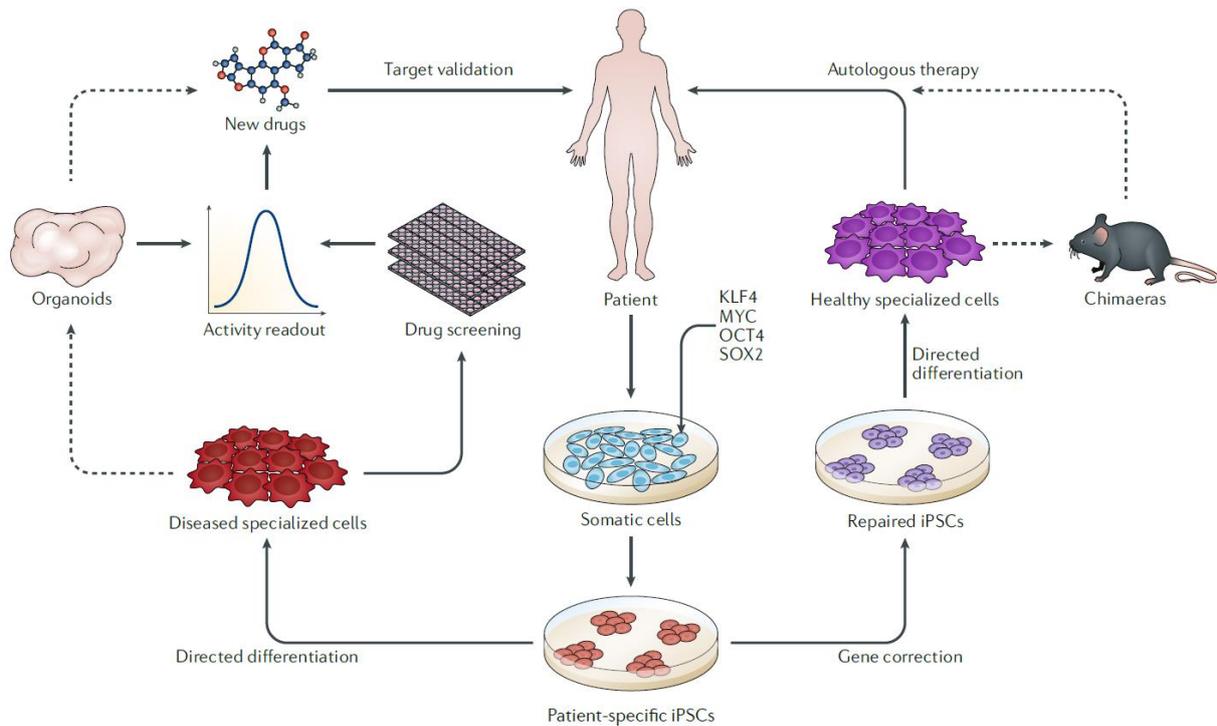


Figura 8. Aplicaciones de las iPSC en el ámbito de la biomedicina. Adaptada de Rowe *et al.*¹¹⁹

2.3.1 Uso de las iPSC en la terapia celular

La diferenciación de iPSC de grado clínico en células somáticas o progenitores ha permitido el descubrimiento de nuevos tratamientos para un amplio rango de enfermedades consideradas intratables. En la actualidad hay varios ensayos clínicos en fase I y II que emplean terapias celulares basadas en el uso tanto de ESC como de iPSC humanas. Estas enfermedades incluyen enfermedades neurodegenerativas, trastornos oculares, infarto de miocardio, diabetes, enfermedades afectando al cartílago o daño en la espina dorsal, entre otros¹²⁰.

En 2017 se llevó a cabo la primera terapia celular basada en iPSC para tratar la degeneración macular¹²¹. En esta terapia se obtuvieron células epiteliales de retina que se prepararon a partir de iPSC derivadas de fibroblastos de la paciente, permitiendo llevar a cabo un trasplante autólogo de estas células en la retina de la propia paciente sin necesidad de utilizar inmunosupresores. La eficacia y la seguridad del trasplante se confirmó un año más tarde. El trasplante a partir de iPSC autólogas tiene la ventaja de evitar el rechazo por parte del sistema inmunológico, pero en la mayoría de los casos no es una estrategia posible para la población general, debido al tiempo, dinero y esfuerzo necesarios para generar las iPSC, confirmar su seguridad y diferenciarlas para trasplante. Otra posibilidad es la terapia celular basada en trasplantes

alogénicos. Actualmente se está generando una biblioteca de iPSC a partir de donantes homocigotos para el antígeno leucocitario humano (HLA), esperando que esas células minimicen el rechazo tras el trasplante y puedan ser utilizadas para terapia celular¹²².

2.3.2 Ensayos toxicológicos

La mayor parte de los fármacos en desarrollo no llegan al mercado debido a efectos adversos en los humanos, siendo los más comunes la toxicidad cardiovascular, hepática y del sistema nervioso central¹²³. La predicción de posibles efectos tóxicos en humanos en las etapas tempranas del desarrollo de fármacos disminuiría significativamente los costes de desarrollo de fármacos, pero esto es difícil debido a la falta de muestras humanas para estudio. Las iPSC pueden suponer una solución a este problema, pudiendo diferenciarse a cardiomiocitos, hepatocitos o neuronas para poder ser utilizados como plataformas para ensayos toxicológicos.

Hoy en día ya hay varios ejemplos de cómo los ensayos toxicológicos basados en iPSC pueden ayudar en el desarrollo de fármacos. Por ejemplo, Sharma *et al.* llevaron a cabo un cribado empleando un panel de 21 quimioterapéuticos inhibidores de quinasas empleando líneas de iPSC de 11 pacientes sanos¹²⁴, ya que se sabe que los fármacos inhibidores de quinasas pueden producir efectos cardiotoxicos, incluyendo disfunción ventricular izquierda, infarto de miocardio y arritmias¹²⁵. El estudio reveló una buena correlación entre la cardiotoxicidad *in vitro* y la incidencia clínica de cardiotoxicidad. Otro ejemplo es el trabajo llevado a cabo por Ware *et al.*, en el que desarrollaron un sistema para estudiar la toxicidad hepática empleando un cocultivo de hepatocitos humanos derivados de iPSC y fibroblastos embrionarios de ratón, para estudiar el efecto de 37 fármacos considerados hepatotóxicos, observando que la mayoría de ellos producían hepatotoxicidad *in vitro* en su sistema¹²⁶.

2.3.3 Modelado de enfermedades empleando iPSC derivadas de pacientes

Las iPSC derivadas de pacientes ha permitido la obtención de células que pueden usarse como modelo *in vitro* para un gran número de enfermedades para las cuales no había ninguno previamente.

Enfermedades neurales

Las iPSC se han utilizado para el estudio de diversas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson¹²⁷.

La ELA se caracteriza por la muerte de neuronas motoras, pero como los pacientes son diagnosticados en estadios tardíos de la enfermedad, faltan modelos humanos para el estudio del desarrollo de la ELA¹²⁸. En 2008, se obtuvieron las primeras neuronas motoras a partir de iPSC derivadas de pacientes con ELA¹²⁹. Desde entonces, se han podido estudiar diversas mutaciones de la ELA usando modelos de iPSC. Se sabe que hay más de 30 mutaciones relacionadas con la ELA en el gen que codifica para la proteína-43 de unión al ADN Tar (TDP-43)¹³⁰ y un estudio llevado a cabo por Egawa *et al.* demostró que las neuronas motoras obtenidas de iPSC derivadas de pacientes con mutaciones en el gen TDP-43 desarrollan agregados citosólicos proteicos como los observados post mortem en neuronas de pacientes con ELA¹³¹. También se ha relacionado el gen de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) con la ELA y se ha podido comprobar que, al diferenciar iPSC con mutaciones en este gen a diferentes tipos neuronales, solo las neuronas motoras muestran agregados citoplasmáticos¹³².

La enfermedad de Alzheimer se debe a un mal plegamiento del péptido β -amiloide y la proteína tau¹³³. En un estudio llevado a cabo por Israel *et al.* se pudo comprobar que las neuronas de iPSC generadas de pacientes con Alzheimer familiar (con una duplicación del precursor del péptido β -amiloide) y pacientes con Alzheimer esporádico tienen elevados niveles del péptido β -amiloide y tau¹³⁴. Esto demostró que las iPSC derivadas tanto de pacientes con Alzheimer familiar como esporádico constituyen un buen modelo para estudiar la enfermedad y el cribado de fármacos. Más adelante, empleando neuronas obtenidas de iPSC con mutaciones en PS1 y PS2, ambos relacionados con la enfermedad de Alzheimer, se pudieron probar fármacos que reducían efectivamente los niveles anormales del péptido β -amiloide¹³⁵.

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y la acumulación de α -sinucleína mal plegada¹³⁶. Empleando una línea de iPSC mutante para la α -sinucleína se ha podido comprobar que el factor de transcripción MEF2C se encuentra inhibido en neuronas dopaminérgicas con esta mutación, produciendo disfunción mitocondrial y apoptosis¹³⁷. También se ha comprobado que las neuronas dopaminérgicas obtenidas de iPSC derivadas de pacientes

con enfermedad de Parkinson con mutaciones en la parkina tienen mayores niveles de estrés oxidativo y mayor liberación de dopamina¹³⁸.

Enfermedades hepáticas

Las primeras iPSC derivadas de pacientes para estudiar enfermedades no neuronales fueron células tipo hepatocito (HLCs por sus siglas en inglés *hepatocyte-like cells*)¹³⁹. Estas iPSC fueron derivadas de pacientes con trastornos metabólicos hereditarios que afectaban al hígado y las HLC generadas mostraron propiedades funcionales de los hepatocitos como la secreción de albúmina y el metabolismo del citocromo *P-450*, además de recapitular las patologías metabólicas que poseían los pacientes. Otros ejemplos de la recapitulación del fenotipo de enfermedades y el descubrimiento de fármacos incluyen el uso de HLC diferenciadas de iPSC de pacientes con enfermedad de Niemann-Pick¹⁴⁰, que causa disfunción hepática, y citrulinemia de tipo 2, una enfermedad metabólica que afecta al ciclo de la urea y produce hígado graso¹⁴¹.

Enfermedades cardíacas

La generación de iPSC específicas de paciente, así como la capacidad de introducir mutaciones causantes de enfermedades en células silvestres a través de la edición génica han permitido el modelado de diversas enfermedades cardiovasculares¹⁴². Entre ellas, se encuentran el síndrome de QT largo^{143,144}, la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica¹⁴⁵, la displasia ventricular derecha arritmogénica¹⁴⁶, la cardiomiopatía dilatada¹⁴⁷, la cardiomiopatía hipertrófica^{148,149} o la cardiomiopatía isquémica¹⁵⁰. En estos casos los cardiomiocitos obtenidos de las iPSC (hiPSC-CM) recapitulan las características de las patologías que poseen las personas de las que se obtuvieron las células. De hecho, en nuestro grupo hemos modelado recientemente la enfermedad de transposición de los grandes vasos utilizando líneas iPSC específicas de pacientes, una enfermedad que constituye un tercio de todas las enfermedades congénitas y que tiene una etiología desconocida¹⁵¹.

Las canalopatías monogénicas, como las que provocan el síndrome de QT largo, son relativamente fáciles de modelar, ya que afectan específicamente a los cardiomiocitos y los análisis para estudiar la función de los canales de iones están bien establecidos^{143,152}. Además, gracias a las nuevas herramientas de edición génica es posible

crear controles isogénicos reparando la mutación en iPSC de los pacientes o generar la mutación en iPSC silvestres¹⁵³.

Las iPSC también se han utilizado para modelar la cardiomiopatía dilatada. El primer estudio de esta enfermedad se basó en derivar cardiomiocitos a partir de pacientes con mutaciones en el gen *TNNT2*, que codifica la troponina cardíaca T, observándose que estos cardiomiocitos poseían una mayor desorganización sarcomérica y anomalías en la regulación del calcio¹⁴⁷. Empleando este modelo se observó que la desorganización sarcomérica podía mejorarse mediante el tratamiento con bloqueantes β -adrenérgicos. En otro estudio llevado a cabo por Hinson *et al.* utilizan microtejidos elaborados a partir de hiPSC-CMs para estudiar la relación entre diferentes mutaciones en la proteína sarcomérica titina y la cardiomiopatía dilatada¹⁵⁴.

Por lo que respecta a la cardiomiopatía hipertrófica, es una enfermedad que afecta a 1 entre 500 personas de la población general y está causada por mutaciones que afectan a genes que codifican para proteínas del sarcómero¹⁵⁵. Se han llevado a cabo investigaciones en hiPSC-CM derivados de pacientes con mutaciones en el gen *MYH7*, que codifica para la cadena pesada de la miosina¹⁴⁹. Los cardiomiocitos con la mutación muestran mayor desorganización sarcomérica e hipertrofia, recapitulando el fenotipo de la enfermedad. Empleando este modelo se realizó un tratamiento con tricostatina A, un inhibidor de la histona deacetilasa, mejorando el fenotipo de la enfermedad, sugiriendo el potencial de este modelo para el descubrimiento de fármacos¹⁵⁶.

Por otra parte, la cardiomiopatía isquémica se encuentra entre las causas más comunes de morbilidad y mortalidad en el mundo¹⁵⁷. En un estudio llevado a cabo por Redd *et al.* se empleó un modelo de daño por isquemia y reperfusión *in vitro* usando hiPSC-CM. En este trabajo se estudió el papel del canal iónico sensor de ácido 1a (ASIC1a) en el daño por isquemia y reperfusión y se comprobó que el uso de inhibidores de dicho canal tiene un efecto cardioprotector¹⁵⁰.

A pesar de las ventajas en el uso de hiPSC-CM para el modelado de enfermedades, hay que tener en cuenta ciertas limitaciones. Una de las más importantes es la inmadurez de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos producidos por la mayoría de los protocolos de cultivo en dos dimensiones son inmaduros, pareciéndose más a los cardiomiocitos embrionarios¹⁵⁸. Los hiPSC-CM son más pequeños que los cardiomiocitos adultos y carecen de su forma rectangular característica. Además, sus miofilamentos

están peor organizados y desarrollan menor fuerza contráctil que los cardiomiocitos adultos. Este estado inmaduro podría enmascarar algunos aspectos claves de los mecanismos de las enfermedades¹⁵⁹. Algunas estrategias para mejorar la madurez de los cardiomiocitos derivados de iPSC incluyen el cultivo prolongado, los cultivos en tres dimensiones, o los estímulos eléctricos y mecánicos¹⁶⁰. Otro aspecto a tener en cuenta es la heterogeneidad celular del corazón. El corazón está formado principalmente por cuatro poblaciones de cardiomiocitos: ventriculares, auriculares, marcapasos y células del sistema de conducción¹⁶¹. Muchos estudios han utilizado poblaciones de cardiomiocitos mixtas, lo que puede enmascarar la respuesta de las células objetivo. No obstante, se han desarrollado protocolos para generar poblaciones enriquecidas en cardiomiocitos ventriculares, auriculares o incluso células marcapasos, permitiendo modelar con mayor precisión enfermedades que afecten a diferentes áreas del corazón¹⁴². Por último, es importante tener en cuenta las poblaciones de células del corazón que no son cardiomiocitos, como los fibroblastos o las células endoteliales, que también pueden contribuir al fenotipo de las enfermedades cardíacas. Por ejemplo, el efecto perjudicial de la fibrosis en la función de los cardiomiocitos en diferentes enfermedades cardíacas está bien documentado¹⁶². Una manera de enfrentarse a este problema para el modelado de enfermedades se basa en la creación de microtejidos que combinen cardiomiocitos, fibroblastos y células endoteliales^{163,164}.

Descubrimiento de fármacos

Los modelos basados en iPSC descritos arriba pueden utilizarse para el descubrimiento de fármacos. Ya que las iPSC son capaces de recapitular el fenotipo de las enfermedades de los pacientes, es posible su utilización para el estudio de mecanismos de acción y el descubrimiento de nuevos fármacos con potencial terapéutico. En la tabla 2 se muestran algunos estudios de gran escala para el descubrimiento de fármacos empleando hiPSC-CM.

Table 2. Examples of large-scale hiPSC-CM chemical screens			
Description	Compounds and results	hiPSC-CMs	References
Cardioprotection in models of diabetic cardiomyopathy	480 bioactive compounds; identification of candidate pathways to ameliorate structural disarray	1 commercial healthy donor and 2 diabetic donor hiPSC-CMs	Drawnel et al., 2014
Cardioprotection in a simulated ischemia model	confirmation of initial screen “hit” and, subsequently, evaluation of optimized analogs that inhibited MAP4K4 and protected against cell death	2 commercial healthy donors	Fiedler et al., 2019
Action potential shortening in LQTS3 and arrhythmia in healthy donor hiPSC-CMs using high-content imaging of transmembrane voltage potentials	~170 mexiletine analogs; refined analogs had increased on-target potency and selectivity for desirable on-target effects with decreased proarrhythmic liability	2 LQTS3 hiPSC-CMs plus drug-induced LQTS3 using 3 healthy donor hiPSC-CMs	McKeithan et al., 2020
Proarrhythmic drug screening of field potentials by MEA recording	Kitaguchi et al. and Blinova et al. reference compounds of high, intermediate, and low/no arrhythmic risk; predictivity was in range of 80%–90%; greatest for discrimination of high + intermediate from low/no risk compounds	2 commercial healthy donor hiPSC-CMs	Blinova et al., 2018 ; Kitaguchi et al., 2016
Cardiotoxicity using kinetic high-content imaging of contractility	21 chemotherapeutic kinase inhibitors; good correlation was observed between the <i>in vitro</i> cardiotoxicity (cell viability and loss of contractility) and the clinical incidence of cardiotoxicity	11 healthy donor hiPSC-CMs	Sharma et al., 2017
Proarrhythmic drug screening using kinetic high-content imaging of Ca ²⁺ transients	108 reference compounds of high, intermediate, and low/no arrhythmic risk; analysis of individual cells within the fields of view increased sensitivity of detection of proarrhythmic phenotypes such as early afterdepolarizations	1 commercial healthy donor hiPSC-CM	Pfeiffer et al., 2016

Tabla 2. Ejemplos de estudios de gran escala para el descubrimiento de fármacos en hiPSC-CM. Adaptada de Hnatiuk *et al.*¹⁶⁵

2.3.4 Modelado de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas empleando iPSC

Como ya se ha comentado anteriormente, los cardiomiocitos derivados de iPSC se emplean en ensayos toxicológicos de diversos fármacos, incluyendo el modelado de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. Los cardiomiocitos derivados de iPSC han sido utilizados para comprender mejor los mecanismos de cardiotoxicidad de la doxorubicina. Por ejemplo, en el trabajo llevado a cabo por Adamcova *et al.* se estudió el efecto de la doxorubicina sobre las troponinas cardíacas en hiPSC-CM¹⁶⁶. En su modelo se pudo comprobar que la doxorubicina disminuía la expresión génica de los genes de la troponina cardíaca T y la I. Asimismo, produce una desorganización de la troponina cardíaca intracelular, produciendo cambios en la morfología celular, además de incrementar la permeabilidad de la membrana de los cardiomiocitos y producir una reorganización de la red mitocondrial. Los hiPSC-CM también han sido utilizados para estudiar las diferencias causadas por la doxorubicina en la expresión de ARNm^{167,168}, miARN^{169,170}, proteínas¹⁷¹ e incluso estudios de metabolómica¹⁷².

Los cardiomiocitos derivados de hiPSC suponen una gran herramienta para el estudio de nuevos fármacos y terapias con efecto cardioprotector frente a la doxorubicina. En un trabajo llevado a cabo por Jay *et al.* se pudo comprobar el efecto cardioprotector de la neuregulina-1 β frente al daño inducido por doxorubicina *in vitro* empleando hiPSC-CM¹⁷³. En otro estudio llevado a cabo por Chatterjee *et al.* se estudió el efecto de la terapia génica con telomerasa para ver si su sobreexpresión en los cardiomiocitos confería protección frente a la doxorubicina¹⁷⁴. Empleando virus adeno-asociados (AAV) sobreexpresaron la telomerasa en cardiomiocitos tanto *in vitro* como *in vivo* y observaron que esta disminuía la apoptosis de los cardiomiocitos y mantenía la función mitocondrial frente al tratamiento con doxorubicina. Otra aplicación interesante de los hiPSC-CM es su uso para los ensayos de cardiotoxicidad de nuevas formulaciones de doxorubicina. En 2012 se llevó a cabo el primer estudio *in vitro* empleando hiPSC-CM para estudiar la seguridad cardíaca de una formulación de doxorubicina liposomal dirigida al receptor de membrana HER2, observándose que el efecto en la viabilidad de los cardiomiocitos era prácticamente nulo, al contrario de lo observado con la doxorubicina libre¹⁷⁵. En otro estudio se demostró que la doxorubicina encapsulada en dendrímeros de poliamidoamina no tenía efecto sobre hiPSC-CM en términos de viabilidad, apoptosis, ni electrofisiología cardíaca¹⁷⁶.

En la mayoría de los estudios antes mencionados se han utilizado líneas de iPSC de donantes sanos. En 2016 Burrige *et al.* llevaron a cabo un innovador trabajo para estudiar si los cardiomiocitos obtenidos de iPSC derivadas de pacientes con cáncer de mama que experimentaron cardiotoxicidad inducida por doxorubicina recapitulan la predisposición al daño por doxorubicina *in vitro*¹⁷⁷. En el trabajo se pudo observar que los hiPSC-CM obtenidos de pacientes que experimentaron cardiotoxicidad eran más sensibles a la toxicidad inducida por doxorubicina que los hiPSC-CM derivados de pacientes que no experimentaron cardiotoxicidad, mostrando una menor viabilidad celular, alteración de la función mitocondrial, desregulación del calcio y mayor estrés oxidativo. De este modo, las iPSC-CM derivadas de pacientes que han sufrido cardiotoxicidad constituyen un buen modelo para la identificación y caracterización de la predisposición genética al daño por doxorubicina, los mecanismos de cardiotoxicidad y búsqueda de biomarcadores y agentes cardioprotectores. Cabe destacar que se han llevado a cabo trabajos similares empleando hiPSC-CM de pacientes que experimentaron cardiotoxicidad frente a otros agentes cardiotóxicos, como el trastuzumab¹⁷⁸.

Recientemente, se han empleado hiPSC-CM de pacientes tratados con antraciclinas que poseen polimorfismos en genes que confieren susceptibilidad o protección frente a las antraciclinas para comprender mejor el papel de estos polimorfismos en la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. En el trabajo llevado a cabo por Christidi *et al.* en 2020 se estudió una variante sin sentido del gen *RARG* que había sido implicada en la susceptibilidad a la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina en un estudio genómico¹⁷⁹. Se emplearon hiPSC-CM de pacientes con la variante que habían sufrido cardiotoxicidad y que poseían la variante sin sentido del gen *RARG*. Se observó que esos hiPSC-CM eran más susceptibles a la doxorubicina que los hiPSC-CM de pacientes que no experimentaron cardiotoxicidad. Además, se generaron controles isogénicos corrigiendo la mutación en el gen *RARG* en las líneas de hiPSC de los pacientes, observando que esta corrección disminuía la susceptibilidad a la doxorubicina en los hiPSC-CM. En otro trabajo llevado a cabo por Magdy *et al.* en 2022 se estudió el papel cardioprotector de una variante en el gen *SLC28A3*, que codifica un transportador de solutos, en hiPSC-CM derivadas de pacientes tratados con antraciclinas poseedores de la variante cardioprotectora¹⁸⁰. Se comprobó que las hiPSC-CM de los pacientes recapitulan la resistencia a la doxorubicina. Gracias al estudio con estos hiPSC-CM se pudo comprobar que la expresión de *SLC28A3* influye en la severidad de la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina. Además, se pudo identificar un inhibidor competitivo de los SLC, la desipramina, como un cardioprotector frente al daño por doxorubicina. Estos trabajos muestran el potencial del uso de cardiomiocitos derivados de hiPSC para validar variantes genéticas asociadas a una mayor susceptibilidad o resistencia al daño inducido por doxorubicina, la búsqueda de nuevos mecanismos de acción y también de nuevos posibles cardioprotectores.

3. Los microARNs en la patología cardiovascular

3.1 Descubrimiento de los microARNs y origen evolutivo

Los microARNs (miARNs) son ARNs pequeños (~22 nucleótidos) no codificantes que inhiben la expresión proteica a nivel post-transcripcional al interactuar con los ARNm¹⁸¹.

Los primeros miARNs fueron descubiertos en *Caenorhabditis elegans* mientras se estudiaban dos genes (*lin-4* y *let-7*) necesarios para su correcto desarrollo^{182,183}. Se

observó que estos genes no producían ARNm, si no que producían ARN no codificante, incluyendo ARNs pequeños de ~22 nucleótidos de longitud. También se observó que tanto *lin-4* como *let-7* poseían sitios complementarios en las regiones no traducidas 3' (3'-UTR) de varios ARNm reguladores, lo que llevo a un modelo en el cual esos ARNs pequeños mediaban la represión traduccional mediante interacciones antisentido^{182,183}. El ARN *let-7* fue descubierto más tarde en humanos y otros animales, con una expresión temporal similar a la observada en *C. elegans*¹⁸⁴. Este descubrimiento llevo a la búsqueda de nuevos ARNs pequeños que pudieran regular la expresión de ARNms¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Estos ARNs eran similares a *lin-4* y *let-7* y, como sus funciones eran desconocidas y lo único que se sabía era que eran pequeños se llamaron microARNs¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

A partir de este punto surgió un gran interés en los microARNs, descubriéndose cientos de miARNs diferentes en humanos, nemátodos, moscas, y otros animales. Los miARNs regulan muchos de los procesos del desarrollo y enfermedades. De hecho, gracias a experimentos de pérdida de función en ratones se ha podido comprobar que los miARNs son necesarios para el correcto desarrollo de numerosos órganos, como por ejemplo hueso, cerebro, ojos, músculo esquelético, corazón, piel o hígado¹⁸¹. También se ha podido comprobar que muchos miARNs humanos están conservados en otros animales. Los miARNs conservados en otros mamíferos tienen interacciones conservadas con muchos de los ARNms humanos¹⁸⁸.

La vía de los miARNs en los animales deriva de la vía de ARN de silenciamiento conocida como interferencia de ARN (ARNi), que parece que estaba presente en el último ancestro común de los eucariotas como mecanismo de defensa frente a virus y transposones¹⁸⁹. La diferencia entre la vía de los miARN es el uso de horquillas cortas para producir ARNs guía para silenciar ARNm específicos, mientras que la vía de ARNi utiliza ARN de doble cadena largo para producir una gran diversidad de ARNs pequeños de interferencia (ARNsi)¹⁹⁰.

3.2 Biogénesis y función de los miARNs

La mayoría de las secuencias de los miARNs maduros se encuentran en intrones o exones de ARNs no codificantes y también en intrones de pre-ARNm¹⁹¹. En la vía

canónica de biogénesis de los miARNs, los genes de miARN se transcriben como ARNs largos llamados miARN primario (pri-miARN), los cuales contienen una o varias estructuras secundarias llamadas horquillas. En el núcleo, los pri-miARNs son procesados en horquillas de aproximadamente 70 nucleótidos, que son los precursores de los miARNs (pre-miARN). Este proceso es llevado a cabo por el complejo microprocesador, formado por la RNasa de tipo III Drosha y la proteína de unión a RNA de doble cadena DGCR8¹⁹². A continuación, los pre-miARNs son exportados al citoplasma a través de las exportinas¹⁹³. En el citoplasma, los pre-miARNs son procesados por la RNasa Dicer, la cual está asociada con la proteína de unión a ARN TRBP. En este procesado se elimina el lazo de la horquilla y se obtiene un ARN de doble cadena pequeño (una de las hebras será el miARN que actuará para regular la expresión génica y la otra es una hebra pasajera)¹⁹⁴. El ARN de doble cadena es cargado en la proteína argonauta (AGO) y la hebra pasajera es eliminada, produciendo el miARN maduro de cadena sencilla. Después de cargar el miARN, la proteína argonauta promueve el ensamblaje de un complejo ribonucleoprotéico llamado complejo de silenciamiento inducido por ARN (complejo RISC), que media el reconocimiento de los ARNm diana¹⁸¹. Los miARNs maduros son guiados a la región 3'-UTR de sus ARNm diana por complementariedad de pares de bases. Si la complementariedad de las secuencias es precisa lleva a la eliminación del ARNm, mientras que si no es precisa reprime su traducción¹⁸¹.

Por otra parte, recientemente se han descrito vías no canónicas de biogénesis de miARNs. Estas producen ARNs funcional y estructuralmente similares a los otros miARNs, pero evitan uno o varios pasos de la vía canónica¹⁹⁵. En la figura 9 se puede ver un esquema de ambas vías de biogénesis de los miARNs.

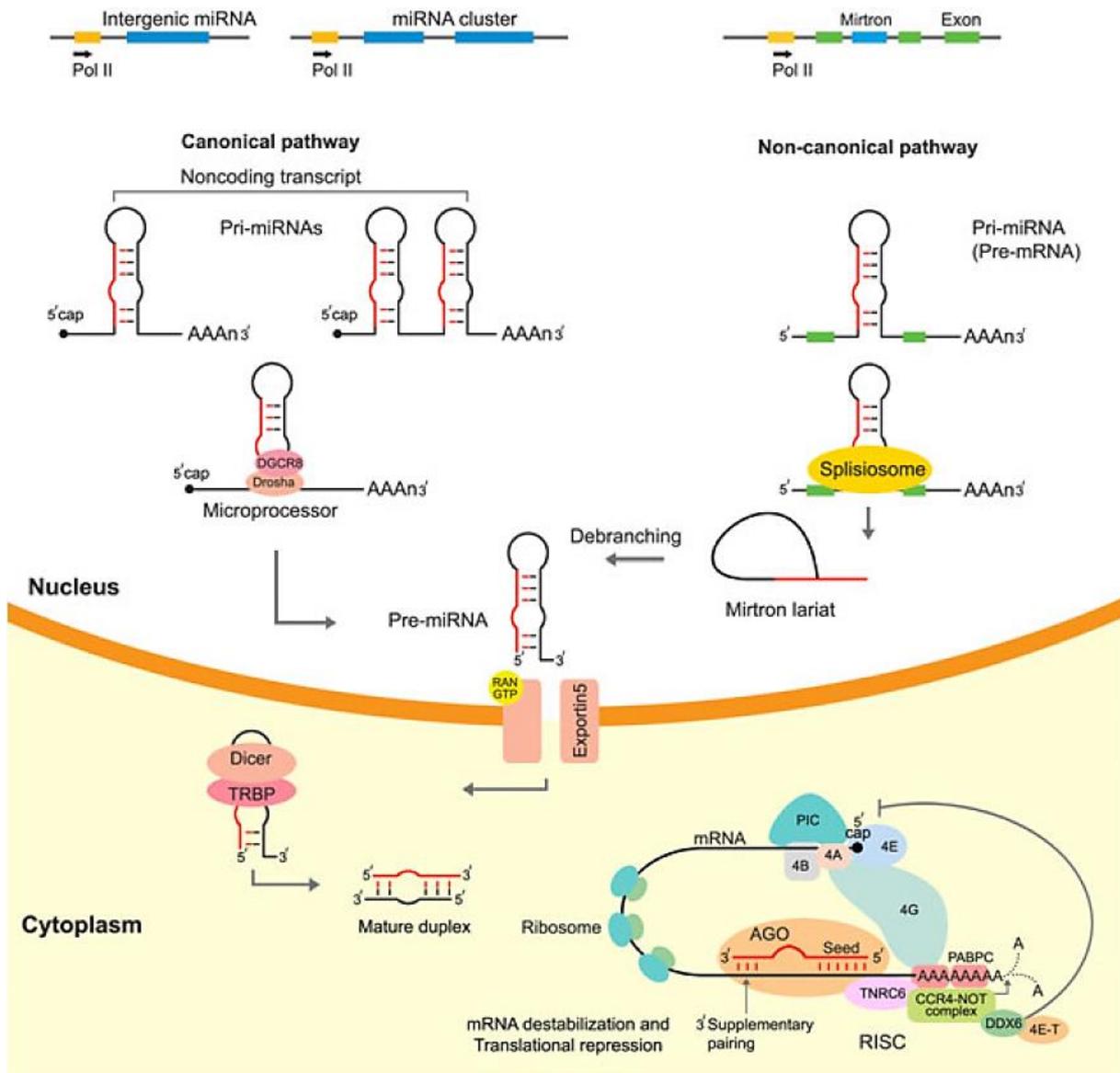


Figura 9. Vías canónica y no canónica de biogénesis de miARNs. Adaptada de Saliminejad *et al.*¹⁹¹

3.3 Los miARNs en la enfermedad cardíaca

Debido a la capacidad de los miARNs de regular la expresión de conjuntos de ARNms y a su importancia durante el desarrollo y la fisiología humana, estos han sido objeto de un exhaustivo estudio en el contexto de múltiples enfermedades con el fin de descubrir nuevos agentes terapéuticos y biomarcadores¹⁹⁶.

3.3.1 Papel de los miARNs como biomarcadores en la enfermedad cardíaca

Los miARNs circulantes son relativamente estables^{197,198}. Esto se debe al efecto protector de sus transportadores frente a las RNasas en circulación, incluyendo complejos proteicos y microvesículas. Esto ha llevado a un número creciente de estudios investigando el potencial de los miARNs como biomarcadores en plasma o suero para diversas enfermedades, incluyendo las enfermedades cardíacas.

Fallo cardíaco

Se han identificado varios miARNs circulantes como potenciales biomarcadores para el fallo cardíaco. En un estudio realizado en pacientes con fallo cardíaco agudo se determinaron los niveles de miARN en plasma y se descubrieron 7 miARNs regulados a la baja entre los casos y los controles (miR-18a-5p, miR-26b-5p, miR-27a-3p, miR-30e-5p, miR-106a-5p, miR-199a-3p y miR-652-3p). La menor expresión de estos miARNs se relacionó con un riesgo incrementado de mortalidad a los 180 días después del ingreso del paciente por fallo cardíaco agudo¹⁹⁹. En otro estudio realizado en pacientes con fallo cardíaco agudo se observó que los niveles elevados de miR-19b-3p se correlacionan con la hipertrofia ventricular²⁰⁰.

Infarto de miocardio

Varios miARNs son detectables en sangre de forma temprana tras el infarto de miocardio. Sin embargo, la comparación con otros biomarcadores de daño cardíaco ya establecidos, como la troponina ultrasensible, demostró que la detección de los miARNs no mejora el diagnóstico obtenido con los métodos actuales²⁰¹. Por este motivo, los nuevos biomarcadores para el infarto de miocardio deberían ser predictivos. En este sentido, varios estudios han encontrado miARNs diferencialmente expresados en pacientes que iban a sufrir un infarto de miocardio. En el trabajo llevado a cabo por Karakas *et al.* se descubrieron tres miARNs (miR-132, miR-140-3p y miR-210) con un valor predictivo elevado para la muerte por un evento cardiovascular²⁰². No obstante, los resultados de este estudio son limitados, ya que se realizó en una cohorte de pacientes con enfermedad coronaria. En otro trabajo realizado por Bye *et al.* se descubrió una firma de 5 miARNs (miR-106a-5p, miR-424-5p, let-7g-5p, miR-144-3p y miR-

660-5p) asociados con un mayor riesgo de sufrir infarto de miocardio en pacientes sanos²⁰³.

Cardiotoxicidad inducida por antraciclinas

Como ya se ha comentado previamente, los biomarcadores clásicos como las troponinas o el NT-proBNP y la ecocardiografía en ocasiones no son lo suficientemente sensibles como para detectar la cardiotoxicidad subclínica, por lo que la búsqueda de nuevos biomarcadores predictores de la cardiotoxicidad inducida por doxorubicinas es particularmente relevante.

El miR-1 es un microARN muy abundante en el corazón y la eliminación de este miARN causa graves defectos cardíacos²⁰⁴. Se ha demostrado que los niveles de miR-1 en sangre aumentan en pacientes de cáncer de mama con cardiotoxicidad inducida por doxorubicina²⁰⁵. Además, este aumento de los niveles de miR-1 están relacionados con alteraciones en la FEVI, observándose una mayor especificidad y sensibilidad en comparación con los niveles de troponina cardíaca I. Leger *et al.* también observaron una elevación de los niveles de miR-1 después de la administración de antraciclinas, en este caso en una cohorte de pacientes pediátricos³⁶. Estas observaciones hacen del miR-1 un posible candidato como biomarcador de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. En el mismo estudio, también se observaron niveles plasmáticos elevados de miR-29b y miR-499 en pacientes con daño cardíaco agudo.

3.3.2 Potencial terapéutico de los miARNs en la enfermedad cardíaca

Mimics y antimiRs de los microARNs

Para llevar a cabo ensayos de ganancia o pérdida de función de microARNs se emplean, respectivamente, mimics o antimiRs de los microARNs objeto de estudio²⁰⁶. Los mimics son oligonucleótidos de doble cadena similares a los precursores de los microARNs que, en el interior de la célula, se procesan en miARNs de cadena sencilla, permitiendo aumentar la expresión de un microARN en concreto. *In vivo*, los microARNs pueden ser suministrados con virus adenoasociados o en formulaciones lipídicas. Los antimiRs, por su parte, son oligonucleótidos antisentido de cadena sencilla

con modificaciones para aumentar su resistencia a las nucleasas. Estos bloquean la función de los miARNs uniéndose a ellos, impidiendo que se unan a sus ARNs diana.

Hipertrofia

El miR-1 ha sido relacionado con la hipertrofia cardíaca. Se ha visto que en el modelo de constricción de la aorta transversal (TAC) en ratón el miR-1 baja su expresión en el corazón antes del desarrollo de hipertrofia²⁰⁷. Además, se ha visto que una de las dianas del miR-1 es el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), que regula el crecimiento celular y la diferenciación y este factor, a su vez, regula la expresión del miR-1²⁰⁸. Empleando antimir del miR-1 se ha visto que producen hipertrofia en cardiomiocitos neonatales de rata, mientras que su sobreexpresión inhibe la hipertrofia²⁰⁹. Además, la administración de mimic del miR-1 empleando AAV en un modelo de hipertrofia cardíaca en rata produjo una regresión de la hipertrofia y reducción de la fibrosis²¹⁰. Por tanto, el miR-1 parece tener un efecto cardioprotector frente a la hipertrofia cardíaca.

Por otra parte, el miR-133 es otro microARN abundante en el miocardio que se encuentra en el mismo loci que el miR-1²¹¹. Se ha visto que este microARN es un regulador de la hipertrofia cardíaca, observándose una menor expresión del miR-133 en modelos tanto murinos como humanos de hipertrofia cardíaca²¹². Además, la administración de miR-133 tanto *in vitro* como *in vivo* inhibe la hipertrofia en un modelo de TAC murino a través de la vía de Akt, mientras que su inhibición *in vitro* e *in vivo* induce la hipertrofia²¹².

Fibrosis

Los fibroblastos poseen un papel fundamental en la patología cardíaca. Se han descrito varios miARNs capaces de estimular la fibrosis. Dos de los más estudiados son el miR-21 y el miR-29. El miR-29 tiene como diana varios genes relacionados con la fibrosis, incluyendo genes que codifican colágenos, fibrilinas y elastina²¹³. Además, los niveles cardíacos de miR-29 están disminuidos en pacientes con fallo cardíaco comparados con los pacientes control. La represión del miR-29 *in vitro* e *in vivo* induce la expresión de colágeno en los fibroblastos, indicando que el miR-29 actúa como un regulador de la fibrosis²¹³. En un modelo de hipertensión inducida por angiotensina II

la sobreexpresión del miR-29b reduce la progresión de la fibrosis y mejora la función cardíaca, destacando la función de este miARN como posible cardioprotector frente a la fibrosis²¹⁴.

Por otra parte, el miR-21 se ha visto incrementado en fibroblastos de pacientes con fallo cardíaco, y es capaz de potenciar la fibrosis cardíaca estimulado la vía de señalización de ERK-MAPK²¹⁵. La inhibición del miR-21 en un modelo de murino de sobrecarga cardíaca redujo la actividad de la vía ERK-MAPK, inhibiendo la fibrosis y atenuando la disfunción cardíaca. En otro estudio se ha visto que el miR-21 incrementa la expresión de la metaloproteínasa-2 en fibroblastos cardíacos de ratón²¹⁶. Estos descubrimientos muestran que el miR-21 puede contribuir a la enfermedad cardíaca estimulando la fibrosis.

Regeneración cardíaca

La capacidad de producir nuevos cardiomiocitos en humanos y otros mamíferos es limitada, ya que los cardiomiocitos solo son capaces de proliferar durante el desarrollo embrionario y fetal e inmediatamente después del nacimiento, para después detenerse de forma permanente^{217,218}. Esto supone un problema, ya que muchas enfermedades cardíacas llevan acompañadas la muerte de cardiomiocitos, siendo la más evidente el infarto de miocardio, que puede llegar a producir la muerte del 25% de estas células, las cuales no se van a poder regenerar²¹⁹. Esto ha motivado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que promuevan la regeneración del corazón.

En un innovador estudio llevado por Eulalio *et al.* se realizó un cribado empleando cientos de mimics de miARNs humanos en cardiomiocitos neonatales de ratón y rata para ver cuáles de ellos podían estimular la proliferación de los cardiomiocitos y por tanto tener potencial para la regeneración cardíaca²²⁰. Entre ellos, se seleccionaron dos, el miR-590-3p y el miR-199a-3p para ser estudiados con mayor profundidad. Se pudo comprobar que la administración de estos miARNs empleando un reactivo lipídico de transfección directamente en el corazón de ratas neonatales promovía la proliferación de los cardiomiocitos, pero no de los fibroblastos. También se pudo comprobar que la expresión prolongada del miR-590-3p o el miR-199a-3p empleando el AAV9, que es un virus con tropismo cardíaco, reduce el infarto y mejora la función cardíaca en un modelo de infarto cardíaco de ratón.

En 2019 se realizó un estudio sobre la capacidad regenerativa del miR-199a-3p en un modelo de infarto de miocardio en cerdo²²¹. El miR-199a-3p fue administrado con AAV6 y, tras un mes del infarto, se observó que los animales tratados con el miARN mostraban mejoras en la función cardíaca, con una mayor masa miocárdica y menor cicatriz fibrótica. No obstante, a tiempos más largos se observó que, en la mayoría de los cerdos tratados, la expresión descontrolada del miARN produjo arritmias súbitas mortales. Estos resultados mostraron que es posible promover la regeneración cardíaca en un modelo de animal grande, pero la dosis y duración del tratamiento deben ser ajustadas y controladas para minimizar los efectos secundarios.

Los virus adenoasociados permiten la expresión prolongada de miARNs exógenos en el corazón y tienen la ventaja de poder dirigirse a órganos en concreto. No obstante, esa expresión prolongada puede tener efectos perjudiciales graves a largo plazo como el descrito arriba. La sobreexpresión transitoria de los miARNs podría ser una solución a este problema. Se ha comprobado que una única inyección intramiocárdica de mimics del miR-199a-3p o el miR-590-3p empleando agentes de transfección lipídicos en un modelo de infarto de miocardio en ratón permite la expresión de estos mimics durante al menos 12 días y es suficiente para estimular la regeneración cardíaca y reducir el tamaño del infarto²²². Cabe destacar que la transfección lipídica de mimics podría afectar a otros tipos celulares del corazón y esto podría afectar a la eficacia y seguridad de los tratamientos.

Cardiotoxicidad inducida por antraciclinas

En los últimos años se ha observado que los miARNs tienen un papel importante en la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas gracias a la regulación de múltiples dianas involucradas en el estrés oxidativo, apoptosis, o la homeostasis del calcio, entre otras²²³. Esto ha producido un aumento de los estudios basados en los miARNs para encontrar nuevos agentes cardioprotectores frente a la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas.

En el trabajo llevado a cabo por Gupta *et al.* se observó que la sobreexpresión de la familia de miARN mir-212/132 en cardiomiocitos neonatales de ratón tratados con doxorubicina atenúa su cardiotoxicidad²²⁴. Además, su sobreexpresión en un modelo de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina en ratones empleando virus AAV9 reduce la atrofia cardíaca y disminuye la apoptosis y el daño miofibrilar.

El factor de transcripción Nrf2 controla la expresión de un conjunto de genes de respuesta al estrés oxidativo, regulando dicha respuesta en condiciones tanto fisiológicas como patológicas²²⁵. Se ha comprobado que la sobreexpresión del miR-200a en un modelo de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina en ratón atenúa su efecto cardiotóxico gracias a la regulación a la alza de Nrf2, reduciendo el estrés oxidativo y la apoptosis cardíaca²²⁶. En otro trabajo se estudió la expresión diferencial de microARNs en tejido cardíaco de ratas tratadas con doxorubicina y controles, encontrándose 18 microARNs diferencialmente expresados²²⁷. Entre ellos, el más aumentado por la doxorubicina fue el miR-140-5p. Se observó que dos de sus genes diana codificaban para Nrf2 y Sirt2, los cuales participan en la defensa de las células frente al estrés oxidativo. Además, los niveles de estrés oxidativo tras el tratamiento con doxorubicina en la línea celular cardíaca H9C2 aumentaron al sobreexpresar el miR-140-5p, mientras que su inhibición produjo una disminución de estos. Por último, el estrés oxidativo miocárdico fue agravado tras suministrar mimic del miR-140-5p en un modelo de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas en ratón, mientras que el tratamiento con antimimic produjo una disminución del estrés oxidativo.

Por otra parte, otros trabajos han demostrado la relación entre otros ARNs no codificantes y los microARNs en el contexto de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. Por ejemplo, en el trabajo llevado a cabo por Han *et al.* se observó que el miR-330-5p disminuye la expresión de SIRT6, survivina y SERCA2a, promoviendo la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas²²⁸. El ARN circular CircITCH actúa como una esponja del miR-330-5p, evitando que interactúe con sus genes diana. La sobreexpresión de CircITCH en un modelo *in vivo* de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas atenuó el daño causado por la doxorubicina al evitar que el miR-330-5p inhibiera a sus genes diana.

En esta tesis se ha estudiado el papel cardioprotector del miR-4732-3p en modelos de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas tanto *in vitro* como *in vivo*. En un trabajo previo de nuestro grupo ya se demostró que el miR-4732-3p tiene un efecto cardioprotector frente al daño por isquemia y reperfusión, es antifibrótico y promueve la angiogénesis²²⁹.

Hipótesis y objetivos

1. Hipótesis

Como se ha comentado en la introducción, las células madre pluripotentes inducidas son una gran herramienta para el modelado de las enfermedades humanas, especialmente si estas son derivadas de pacientes con la enfermedad a estudiar. Por lo que respecta a la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas, ya se ha comprobado que los cardiomiocitos obtenidos de iPSC derivadas de pacientes con cáncer de mama que sufrieron cardiotoxicidad inducida por antraciclinas recapitulan la predisposición al daño. Con estos antecedentes nos planteamos la siguiente hipótesis:

- Los cardiomiocitos derivados de hiPSC de pacientes oncológicos pediátricos que sufrieron cardiotoxicidad temprana inducida por antraciclinas son más susceptibles al daño por doxorubicina que los cardiomiocitos control, constituyendo un buen modelo de enfermedad.

Por otra parte, en los últimos años se ha demostrado el papel de los miARNs en la patología cardíaca, mostrando un papel cardioprotector o cardiotóxico en diferentes contextos. Nosotros descubrimos un miARN, el miR-4732-3p, que se encuentra desregulado en pacientes con cáncer de mama que experimentaron cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. Además, este miARN ha demostrado tener un efecto cardioprotector frente al daño por isquemia y reperfusión. Por estos motivos, nos planteamos la siguiente hipótesis:

- El miR-4732-3p tiene un efecto cardioprotector frente al daño inducido por doxorubicina y podría constituir una herramienta terapéutica para el tratamiento del daño cardíaco causado por la doxorubicina.

2. Objetivos

Para estudiar el efecto de la doxorubicina en los cardiomiocitos de los pacientes que sufrieron cardiotoxicidad y en los cardiomiocitos control nos planteamos los siguientes objetivos:

- Determinar la viabilidad, niveles de apoptosis y niveles de estrés oxidativo de los cardiomiocitos después del tratamiento con doxorubicina.
- Evaluar el efecto de la doxorubicina en el estrés genómico y mitocondrial de los cardiomiocitos.

- Estudiar la desorganización de los sarcómeros en los cardiomiocitos tratados con doxorubicina.
- Estudiar las diferencias en la expresión génica y de miARNs causadas por la doxorubicina.

Por otro lado, para evaluar el papel cardioprotector del miR-4732-3p nos planteamos los siguientes objetivos:

- Estudiar *in vitro* en cardiomiocitos neonatales de rata y fibroblastos cardíacos de rata el efecto de la sobreexpresión del miR-4732-3p sobre el descenso de la viabilidad, el aumento de la apoptosis y el aumento del estrés oxidativo causados por la doxorubicina.
- Determinar el efecto beneficioso de la administración del miR-4732-3p en un modelo de cardiotoxicidad inducido por doxorubicina en rata, estudiando la función cardíaca, el estrés oxidativo, la apoptosis, la fibrosis y la vascularización.
- Buscar posibles genes diana del miR-4732-3p.
- Estudiar el efecto de la sobreexpresión del miR-4732-3p en las líneas de cardiomiocitos derivados de hiPSC de los pacientes y controles frente al daño causado por la doxorubicina.

Material y métodos

1. Pacientes

Para la derivación de hiPSC se reclutaron dos pacientes oncológicos pediátricos que desarrollaron cardiotoxicidad temprana inducida por antraciclinas. La cardiotoxicidad se definió como una bajada de la fracción de eyección ventricular izquierda mayor de 10 puntos porcentuales, hasta llegar a un valor de FEVI menor del 53% (valor de referencia normal para la ecocardiografía de dos dimensiones)^{15,16}.

Para el estudio de miARNseq en suero se estudió una cohorte compuesta por 10 pacientes con cáncer de mama que experimentaron cardiotoxicidad inducida por antraciclinas durante el primer año tras terminar la quimioterapia (casos) y 10 pacientes que no experimentaron cardiotoxicidad (controles).

2. Declaración ética animal

Los procedimientos con animales han sido aprobados por los comités éticos institucionales y locales de cuidado de animales conforme a las directrices de la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo en la protección de animales empleados con fines científicos, reforzada por la ley española bajo el Real Decreto 1201/2005 (procedimientos aprobados por la Generalitat Valenciana 2019/VSC/PEA/0249 para el mantenimiento de colonia de ratas Wistar y 2019/VSC/PEA/0260 para el modelo de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina en rata).

3. Cultivo celular

3.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en esta tesis están descritos en la tabla 3.

Medio de cultivo	Tipo celular	Compuesto	Concentración	Casa comercial
mTeSR™ Plus completo	hiPSC	mTeSR™ Plus Basal Medium	-	StemCell™ Technologies
		mTeSR™ Plus 5X Supplement	1X	StemCell™ Technologies
		P/S	1%	Gibco

Material y métodos

RPMI/B-27 sin insulina	Diferenciación hiPSC-CM	RPMI 1640	-	Gibco
		Suplemento B-27 50X, sin insulina	1X	Gibco
		Ácido L-ascórbico	0,2 mg/ml	Sigma-Aldrich
		P/S	1%	Gibco
RPMI/B-27 con insulina	Diferenciación y mantenimiento hiPSC-CM	RPMI 1640	-	Gibco
		Suplemento B-27 50X, con insulina	1X	Gibco
		Ácido L-ascórbico	0,2 mg/ml	Sigma-Aldrich
		P/S	1%	Gibco
RPMI/B-27 con insulina sin glucosa	Diferenciación hiPSC-CM	RPMI 1640 sin glucosa	-	Gibco
		Suplemento B-27 50X, con insulina	1X	Gibco
		Ácido L-ascórbico	0,2 mg/ml	Sigma-Aldrich
		Lactato	4 mM	Sigma-Aldrich
RPMI/B-27 con insulina 20% FBS	Siembra hiPSC-CM	RPMI 1640	-	Gibco
		Suplemento B-27 50X, con insulina	1X	Gibco
		FBS	20%	Gibco
		Ácido L-ascórbico	0,2 mg/ml	Sigma-Aldrich
		P/S	1%	Gibco
Medio de siembra NRCM	NRCM	DMEM 4,5 g/L glucosa	-	Gibco
		M199	20%	Gibco
		FBS	15%	Gibco
		P/S	1%	Gibco
Medio de mantenimiento NRCM	NRCM	DMEM 4,5 g/L glucosa	-	Gibco
		M199	20%	Gibco
		HS	4%	Gibco
		P/S	1%	Gibco
DMEM/F-12 completo	RCF	DMEM/F-12	-	Gibco
		FBS	10%	Gibco
		P/S	1%	Gibco
Fibroblast Growth Medium 3 completo	HCF	Fibroblast Growth Medium 3	-	PromoCell
		P/S	1%	Gibco

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo celular empleados. P/S = penicilina/estreptomicina, FBS = suero bovino fetal, HS = suero de caballo.

3.2 Células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC)

En el presente estudio se utilizaron dos líneas de hiPSC derivadas de pacientes oncológicos pediátricos llamadas Ct PBiPS1-SV4F-1 (CTX1) y Ct PBiPS2-SV4F-1 (CTX2). Como líneas control se utilizaron las líneas de hiPSC FiPS CTRL1-SV4F-7 (CTRL1) y la FiPS CTRL2-SV4F-1 (CTRL2). El registro, depósito y caracterización de estas líneas se puede encontrar en el siguiente enlace: <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/BIOBANCOS/BNLC/Paginas/LineasiPS.aspx>.

Las hiPSC sin diferenciar se cultivaron en placas de 6 pocillos previamente tratadas con Matrigel® (Matrigel® hESC-qualified; Corning, Tewksbury, MA, EE. UU.) en medio mTeSR™ Plus (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) a 37°C y 5% de CO₂. Las hiPSC se expandieron hasta alcanzar una confluencia del 80% antes de pasarlas. Para pasar las hiPSC las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS; HyClone, Logan, UT, EE. UU.) y posteriormente se incubaron con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,5 mM durante 4 min a 37°C. A continuación, el EDTA se aspiró y las colonias de hiPSC se despegaron del pocillo utilizando el medio mTeSR™ Plus. Las colonias de hiPSC se pasaron a un nuevo pocillo previamente tratado con Matrigel® y ya con medio mTeSR™ Plus en una proporción de 1:5 a 1:20.

3.3 Diferenciación cardiaca

Las hiPSC se diferenciaron a cardiomiocitos (hiPSC-CM) mediante la modulación de la vía de señalización de WNT utilizando un protocolo adaptado de Kleinsorge *et al*³⁰. Para la diferenciación, las hiPSC se individualizaron y sembraron en placas de 6 pocillos previamente tratadas con Matrigel® a una densidad de $2 \cdot 10^5$ células/ml. Las células se mantuvieron en mTeSR™ Plus hasta que alcanzaron una confluencia del 70-80% (1-2 días desde que se sembraron), momento en el que comenzó la diferenciación. En el día 0 el mTeSR™ Plus se sustituyó por medio RPMI/B-27 sin insulina con el activador de la vía de WNT CHIR999021 (6 µM; StemCell Technologies) para inducir mesodermo. El CHIR999021 se mantuvo desde el día 0 al 2, momento en el cual se cambió el medio y se añadió RPMI/B-27 sin insulina suplementado con el inhibidor de la vía de WNT IWP-4 (5 µM; StemCell Technologies), para inducir linaje cardíaco. El IWP-4 se mantuvo desde el día 2 al 4. Desde el día 4 al 8 las células se

mantuvieron en RPMI/B-27 sin insulina. A partir del día 8 de diferenciación las células comenzaron a latir. Desde el día 8 al día 11 el medio se cambió por RPMI/B-27 con insulina. En el día 11 se realizó un proceso de selección metabólica para purificar los cardiomiocitos utilizando medio RPMI/B-27 con insulina, lactato y sin glucosa. El lactato como única fuente de energía solo permite la supervivencia de las células con un metabolismo similar al cardíaco. La selección metabólica se mantuvo hasta el día 16, momento en el cual el medio se cambió de nuevo a RPMI/B-27 con insulina para permitir la recuperación de los cardiomiocitos.

El día 18 los hiPSC-CM pueden disgregarse y sembrarse a una menor densidad para futuros experimentos. Para despegar los hiPSC-CM, se hicieron dos lavados con EDTA 0,5 mM y, después, se incubaron con tripsina/EDTA (Thermo Fisher Scientific) 10 min a 37°C. La tripsina se neutralizó con RPMI/B-27 con insulina y 20% de FBS. Para disgregar los hiPSC-CM, estos se pipetearon arriba y abajo con una micropipeta de 1000 µl con suavidad. Los hiPSC-CM se centrifugaron, se resuspendieron en medio RPMI/B-27 con insulina y 20% de FBS, se pasaron por un *cell strainer*, se contaron en una cámara de Neubauer y se volvieron a sembrar a una densidad de $2 \cdot 10^5$ células/cm². Las células se mantuvieron en medio con FBS durante dos días para ayudar a la recuperación de los cardiomiocitos y después se mantuvieron con RPMI/B-27 + insulina hasta el momento de realizar los experimentos.

3.4 Cultivos primarios

Para modelar la cardiotoxicidad causada por la doxorubicina *in vitro* se han utilizado cultivos primarios de células cardíacas de rata. En concreto, se han aislado cardiomiocitos neonatales de rata (NRCM) y fibroblastos cardíacos de Rata (RCF). También se ha utilizado una línea comercial de fibroblastos cardíacos humanos (HCF).

3.4.1 Aislamiento de cardiomiocitos neonatales de rata

Los NRCM se aislaron empleando el protocolo descrito por Armiñán *et al.*²³¹ con algunas modificaciones. Las crías de rata de 0 a 2 días de edad se sacrificaron por decapitación, se pusieron en una bandeja con hielo, se rociaron con etanol y se introdujeron en una cabina de flujo laminar. Los corazones se extrajeron y pusieron en placas Petri con solución tamponada de sales Hank (HBSS sin Ca ni Mg). Los corazones se

lavaron dos veces con HBSS para eliminar el exceso de sangre, se quitaron las aurículas y los ventrículos se trocearon con un bisturí. Los fragmentos de corazón se incubaron en HBSS con tripsina 0,05% a 4°C toda la noche en agitación suave (1 ml de HBSS con tripsina por cada corazón). El día siguiente los trozos de corazón se pasan a un tubo de 50 ml, se deja que sedimenten y se aspira el HBSS con una pipeta de 25 ml, evitando aspirar los trozos de corazón. Después, los trozos de corazón se digirieron durante 40 min a 37°C en una mezcla enzimática (0,04% colagenasa y 0,02 mg/ml DNasa) en medio Leibovitz L15. Transcurrido ese tiempo el medio se recoge en un tubo de 50 ml, se deja que los fragmentos de corazón sedimenten y el sobrenadante se descarta, ya que este primer sobrenadante contiene fundamentalmente eritrocitos y células muertas. Los trozos de corazón se digirieron durante 20 min en la misma mezcla de enzimas a 37°C. Esta digestión se repite hasta que no queden fragmentos de corazón. El sobrenadante de cada digestión se recoge, centrifuga a 90 x g durante 5 min y las células se resuspenden y siembran en medio de siembra de NRCM. Después las células se incubaron durante 1,5 h bajo condiciones estándar de cultivo celular (37°C y 5% de CO₂) para permitir que los fibroblastos se adhieran a las placas de cultivo. A continuación, el medio que contiene las células sin pegar se centrifugó y el sobrenadante se descartó. Los cardiomiocitos se resuspendieron en medio de siembra de NRCM y se sembraron en placas de cultivo previamente tratadas con 0,1% de gelatina a una densidad de $1,5 \cdot 10^5$ células/cm² para futuros experimentos. El día siguiente, los NRCM se lavaron 3 veces con PBS para eliminar eritrocitos y células muertas y el medio se sustituyó por medio de mantenimiento de NRCM. A los 2-3 días de ser aislados se puede observar cómo los NRCM comienzan a contraerse espontáneamente.

3.4.2 Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos de rata

Para el aislamiento de RCF, se extrajeron corazones de crías de rata de 0 a 2 días de edad, se trocearon y se incubaron en medio DMEM F-12 con 0,075% de tripsina/EDTA durante 10 min a 37°C. El sobrenadante de la digestión se eliminó, y los fragmentos de corazón se incubaron con una mezcla de enzimas formada por 0,2% colagenasa II y 0,01 mg/ml DNasa I en DMEM F-12 durante 30 min a 37°C. A continuación, se recogió y centrifugó el sobrenadante con las células en suspensión a 300 x g durante 5 min. Los RCF se resuspendieron en DMEM F-12 completo y se sembraron en placas de cultivo. Al día siguiente se cambió el medio de nuevo por DMEM F-12.

3.4.3 Cultivo de fibroblastos cardíacos humanos

Los fibroblastos cardíacos humanos (HCF) se compraron a PromoCell® (Heidelberg, Alemania) y se cultivaron en Fibroblast Growth Medium 3 (PromoCell®) a 37°C y 5% de CO₂.

4. Análisis de marcadores cardíacos por citometría de flujo

Para determinar el porcentaje de hiPSC-CM obtenido durante la diferenciación, se analizó la expresión de marcadores cardíacos por citometría de flujo. Después de la diferenciación, las células se lavaron con PBS 2 veces y se incubaron con tripsina/EDTA 10 min a 37°C. La tripsina se inactivó con FBS, se centrifugaron las células y se aspiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron y fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 min a 4°C. A continuación, las células se centrifugaron de nuevo, se aspiró el PFA y se realizaron tres lavados con PBS. Después, las células se bloquearon y permeabilizaron con solución de bloqueo y permeabilización hecha de 0,5% FBS y 0,01% Triton-X100 (Sigma-Aldrich) en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se incubaron con anticuerpos marcados con fluoróforos contra la cadena pesada de la miosina (MHC; 1/200; 564408; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) y la troponina cardíaca I (cTnI; 1/200; 554409, BD Pharmingen) durante 1 h a RT, preparados en solución de bloqueo y permeabilización. Se realizaron dos lavados con PBS y, finalmente, las células se resuspendieron con PBS y se analizaron con un citómetro FACS Canto II (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). En el experimento se utilizaron controles isotipo (PE Isotype control, 550617; Alexa Fluor® 647 Isotype control, 558713; ambos de BD Pharmingen) a la misma concentración que los anticuerpos marcados. El porcentaje de células positivas para MHC y cTnI se determinó con el programa FlowJo X (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA).

5. Tratamiento con doxorubicina *in vitro*

Para el modelado de la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina *in vitro*, las células cardíacas (hiPSC-CM, NRCM y RCF) se trataron con doxorubicina a una concentración 1 μM durante 48 h para la mayoría de los experimentos. No obstante, para el estudio del estrés oxidativo *in vitro* se utilizó un tratamiento de doxorubicina a 5 μM durante 24 h, ya que en con el tratamiento antes descrito no se observaron diferencias entre las células tratadas con doxorubicina y las no tratadas.

Para comprobar el efecto cardioprotector del dexrazoxano en los hiPSC-CM se realizó un pretratamiento con dexrazoxano 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h y, después, las células se trataron con doxorubicina 1 μM durante 48 h.

6. Inmunofluorescencia en células

Los hiPSC-CM se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pocillos, previamente tratados con gelatina 0,1%. Tras 5-7 días los hiPSC-CM se trataron con doxorubicina 1 μM durante 48 h y después se estudió la expresión y localización de diferentes proteínas mediante inmunofluorescencia. Para llevar a cabo la inmunofluorescencia, el medio de cultivo que tenían las células se aspiró y se realizaron 2 lavados con PBS. Después, los hiPSC-CM se fijaron con PFA al 4% durante 15 min a 4°C y, posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS. Las células se bloquearon y permeabilizaron durante 1 h a RT. A continuación, se incubaron con los anticuerpos primarios (tabla 4) durante toda la noche a 4°C en oscuridad. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS 3 veces y se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 2 h a RT en oscuridad. Los cardiomiocitos se lavaron 3 veces con PBS y se tiñeron con DAPI a 200 ng/ml (Thermo Fisher Scientific) durante 10 min. Después, los cubreobjetos se lavaron y se montaron en portaobjetos usando el reactivo FluorSave™ (CalbioChem, San Diego, CA, USA). Finalmente, los hiPSC-CM se observaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM2500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

La desorganización de los sarcómeros en los hiPSC-CM se cuantificó a partir de las imágenes de la tinción de la α -actinina sarcomérica empleando el programa informático ImageJ.

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti-actinina sarcomérica	Ratón	1/200	Sigma-Aldrich	A7811
Anti-troponina cardiaca T	Ratón	1/200	Abcam	ab8295
Anti-p-histona γ -H2AX	Ratón	1/200	Merck Millipore	05-636-200
Anticuerpos secundarios				
Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia
Alexa Fluor® 488 anti-ratón	Cabra	1/200	Thermo Fisher Scientific	A11001
Alexa Fluor® 555 anti-ratón	Cabra	1/200	Thermo Fisher Scientific	A32727

Tabla 4. Anticuerpos empleados para inmunofluorescencia de células en cultivo.

7. Ensayos de citotoxicidad y apoptosis *in vitro*

7.1 Ensayo de viabilidad celular CCK8

La viabilidad celular de los distintos tipos celulares en presencia o ausencia de doxorrubicina se determinó empleando el *Cell Counting Kit-8* (CCK8; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). El CCK8 se metaboliza en las células y produce un compuesto coloreado soluble cuya concentración es proporcional al número de células viables en el cultivo. Tras el tratamiento con doxorrubicina las células se incubaron con el reactivo CCK8 al 10% en sus respectivos medios de cultivo durante 3 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se determinó la absorbancia de los medios de cultivo a 450 nm utilizando un lector de placas (Halo LED 8; Dynamica Scientific, Newport, Pagnell, UK).

7.2 Ensayo lactato deshidrogenasa

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se encuentra en condiciones normales en el citoplasma de la célula. No obstante, cuando se daña la membrana plasmática como consecuencia de la exposición a un agente citotóxico, la LDH es liberada al medio de cultivo. Se determinó la actividad LDH en el sobrenadante de hiPSC-CM, NRCM y

RCF con distintos tratamientos empleando el *Cytotoxicity Detection Kit Plus* (Roche, Indianápolis, IN, EE. UU.). Para ello, se recogieron 100 µl del sobrenadante de las células, se mezclaron con 50 µl de la mezcla de reactivos del kit y se incubaron 30 min a RT. Después se determinó la absorbancia de la mezcla a 492 nm, que es proporcional a la actividad LDH, empleando el lector de placas Halo LED 8.

7.3 Tinción de anexina-V y DAPI

Para determinar el porcentaje de células en apoptosis, se llevó a cabo una tinción con anexina V-FITC y DAPI (R&D Systems, Mineápolis, MN, EE. UU.). La anexina V es una proteína capaz de unirse a la fosfatidilserina, un fosfolípido que habitualmente se encuentra en la hemimembrana celular interna, pero que se transloca a la hemimembrana celular externa cuando las células entran en apoptosis. El DAPI es un fluorocromo que se une al DNA y emite fluorescencia azul, y este solo puede atravesar la membrana dañada de células en apoptosis tardía o necrosis. De este modo, al realizar la tinción doble, las células negativas para ambos marcadores serán células viables, las células solo positivas para anexina V-FITC estarán en apoptosis temprana y las células positivas para anexina V-FITC y DAPI estarán en apoptosis tardía o necrosis.

Para llevar a cabo la tinción, después de los diferentes tratamientos, el sobrenadante de las células se recogió en un tubo Eppendorf y después se lavaron una vez con PBS, que también se recogió. Esto se realiza porque puede haber células en apoptosis despegadas en el medio. A continuación, las células se despegaron con tripsina/EDTA, se añadieron a sus respectivos tubos con el medio y el lavado previamente recogidos, y se centrifugaron a 1000 rpms durante 5 min. Después, se resuspendieron en tampón de unión con anexina V-FITC y DAPI y se incubaron durante 15 min a RT. Pasado este tiempo, se añadió un volumen de tampón de unión y se determinó el porcentaje de células positivas para anexina V y DAPI por citometría de flujo en un citómetro FACS Canto II.

7.4 Actividad caspasa 3/7

Las caspasas son las proteínas efectoras de la apoptosis, por lo que una mayor actividad caspasa 3/7 implica unos niveles elevados de apoptosis en el cultivo celular. Se determinó la actividad caspasa 3/7 en hiPSC-CM tras el tratamiento con doxorubicina

empleando el *Caspase-Glo® 3/7 assay system* (Promega, Madison, WI, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El reactivo *Caspase-Glo®* se añadió a las hiPSC-CM sembradas en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 30 min a RT en oscuridad. Este reactivo es procesado por las caspasas y da lugar a un producto luminiscente. La luminiscencia se determinó empleando un lector de placas Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, EE. UU.)

8. Ensayos de estrés oxidativo *in vitro*

8.1 DCFH-DA

Para estudiar la cantidad total de especies reactivas de oxígeno (ROS) se llevó a cabo una tinción con DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate; Sigma-Aldrich). El DCFH-DA es oxidado por las ROS y se produce un compuesto que emite fluorescencia verde, por lo que a mayor intensidad de fluorescencia mayor la cantidad de ROS en las células. Tras los diferentes tratamientos, las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con 5 μM de DCFH-DA en medio de cultivo sin suero durante 30 min en el incubador a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron 2 veces con PBS para eliminar el exceso de tinción, se despegaron con tripsina y se analizó la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo usando un citómetro FACS Canto II. Los datos se analizaron usando el programa informático FlowJo X.

8.2 MitoSOX

Se estudiaron los niveles de superóxido mitocondrial empleando MitoSOXTM Red (Thermo Fisher Scientific). En este caso las células se tiñeron con 5 μM de MitoSOXTM en medio de cultivo sin suero siguiendo el mismo protocolo que con el DCFH-DA. La intensidad de fluorescencia también se determinó por citometría de flujo y los datos se analizaron con el FlowJo X.

8.3 Glutati3n reducido

El glutati3n reducido (GSH) es un compuesto que se utiliza en la detoxificaci3n de ROS, proceso en el cual se convierte en glutati3n oxidado (GSSG). Por tanto, la depleci3n de GSH implica unos mayores niveles de estr3s oxidativo del cultivo. Para determinar los niveles de GSH en los hiPSC-CM, se emple3 el *GSH-Glo® Glutathione Assay* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La luminiscencia se determin3 con un lector de placas Synergy H1.

9. Estudio del potencial de membrana mitocondrial

Para el estudio del potencial de membrana mitocondrial se emple3 el colorante JC-1 (T3168; Thermo Fisher Scientific). El JC-1 es un compuesto que en su forma monom3rica emite fluorescencia de color verde (Ex/Em: 488/529 nm). En las c3lulas viables, el JC-1 es capaz de entrar selectivamente en las mitocondrias y concentrarse en la matriz mitocondrial, formando agregados y cambiando su fluorescencia de color verde a color rojo (Ex/Em: 535/590). No obstante, en las c3lulas en apoptosis y necrosis, las mitocondrias disipan su potencial de membrana y el JC-1 difunde fuera de la mitocondria y vuelve a su forma monom3rica, tiñendo la c3lula de color verde.

Los hiPSC-CM fueron sembrados en placas de 48 pocillos y, tras el tratamiento con doxorubicina, las c3lulas se lavaron con PBS y se tiñeron con JC-1 a 10 µg/ml 20 min a 37°C. A continuaci3n, las c3lulas se lavaron tres veces con PBS para eliminar el exceso de tinci3n y se añadi3 medio RPMI/B-27 con insulina. La tinci3n con JC-1 es una tinci3n vital, por lo que los cambios en la fluorescencia del JC-1 se registraron empleando un microscopio Leica DMI8 Platform Live Cell con temperatura y CO₂ controlados (Leica Microsystems). De cada pocillo se obtuvieron im3genes de 8 campos distintos registrando la fluorescencia verde y la roja. La intensidad de fluorescencia se cuantific3 utilizando el programa inform3tico ImageJ.

10. Transfecci3n celular

Para comprobar si el hsa-miR-4732-3p tiene un efecto cardioprotector frente a la doxorubicina, se estableci3 un protocolo de transfecci3n usando miARNs sint3ticos llamados mimics, ya que la transfecci3n permite la sobreexpresi3n transitoria de un

miARN en las células. Se utilizaron dos mimics distintos, uno del hsa-miR-4732-3p (Mimic-4732) y otro del cel-miR-243-3p, un miARN de *Caenorhabditis elegans* que se utilizó como control negativo (Mimic-NC) (MISSION miRNA Mimic, Merck KGaA). Para la transfección se utilizó lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific), una nanopartícula lipídica que permite la transfección de miARNs. Para la transfección, por una parte, se diluyeron los Mimics individualmente con medio bajo en suero OptiMem™ (Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 0,8 μM . Por otra parte, se diluyó la lipofectamina 3000 en una relación 1:25 también en OptiMem™. Volúmenes iguales de los Mimics y de la lipofectamina diluidos en OptiMem™ se mezclaron y se incubaron durante 15 min a RT para permitir la formación de complejos lipofectamina-mimic. Los complejos lipofectamina-mimic se añadieron a las células de modo que la concentración final de mimic fuera de 40 nM. Las células se incubaron durante 24 h con los complejos lipofectamina-mimic y, a continuación, se llevaron a cabo los distintos tratamientos o experimentos.

11. Métodos de biología molecular

11.1 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN las células se mantuvieron en frío poniendo las placas en una bandeja con hielo. Se realizó un lavado con PBS y se añadió tampón de lisis celular RLT. Con ayuda de una pipeta se recogió el lisado en tubos Eppendorf. En este punto se puede congelar el lisado celular a -80°C o proceder con la purificación del ARN. Para purificar el ARN se utilizó el kit comercial basado en columnas RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ARN extraído se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). La calidad del ARN extraído se determinó gracias a las ratios de absorbancia 260/280, que indica contaminación proteica, y el 260/230, que indica contaminación por componentes orgánicos.

11.2 Retrotranscripción de ARN

Tras aislar y cuantificar el ARN, este se utilizó como molde para obtener el ADN complementario (ADNc) por retrotranscripción. Para ello, se empleó el PrimeScript RT

Reagent Kit (Takara, Kusatsu, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf utilizando 1 µg de ARN en todas las muestras. Se utilizó un ciclo de temperatura de 15 min a 37°C, 5 seg a 85° y finalmente se mantuvo a 4°C. El ADNc se guardó a -20°C hasta la realización de la RT-qPCR.

11.3 RT-qPCR de ARN

La RT-qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) permite determinar la cantidad relativa de ARNm entre diferentes muestras. El ADNc obtenido anteriormente se diluyó 1:10 con agua libre de nucleasas para evitar que los reactivos de la transcripción inversa afecten a la RT-qPCR. Los cebadores sentido y antisentido utilizados se diseñaron mediante la herramienta Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y se compraron a Condalab (Madrid, España). Para llevar a cabo la RT-qPCR se empleó el TB Green® Premix Ex Taq™ (Takara). Cada reacción de RT-qPCR estuvo formada de 2 µl de ADNc diluido, 0,34 µl de cada cebador, 2,32 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl del *Master Mix*. Se realizaron triplicados técnicos para cada muestra y gen, ya que es una reacción muy sensible y pequeñas variaciones en las concentraciones de los reactivos pueden provocar variaciones importantes en los resultados obtenidos. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando placas de 384 pocillos (A36931; Thermo Fisher Scientific) en un termociclador Viiia 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, EE. UU.) utilizando el protocolo detallado en la tabla 4.

Los cebadores empleados en este trabajo están detallados en la tabla 5.

Protocolo para la RT-qPCR			
Paso	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	-
PCR (desnaturalización e hibridación/extensión)	95°C 60°C	15 s 1 min	40
Enfriamiento	4°C	-	-

Tabla4. Protocolo empleado para la RT-qPCR.

Cebadores		
Gen	Cebador F	Cebador R
hOCT4	ATGCACAACGAGAGGATTTTG	CAGAGTGGTGACGGAGACAG
hSOX2	CCCCCGGCGGCAATAGCAT	TCGGCGCCGGGAGATACAT
hMYH7	GCCCCTTTCCTCATCTGTAGAC	TCATCAGGCACGAAGACATCC
hTNNT2	AGACAGAGCGGAAAAGTGGG	GTCGAACTTCTCTGCCTCCAA
hNQO2	TGGTCGGAAGATTGCTGGAC	CTTGGGTTCTGGTGTGCAT
hNOS3	GTGGTAACCAGCACATTTGGG	TCTGAGCAGGAGATGCTGTTG
hSOD1	ACAAAGATGGTGTGGCCGAT	AACGACTTCCAGCGTTTCCT
hTXN	GGTGAAGCAGATCGAGAGCA	ACATCCTGACAGTCATCCACAT
hCAT	TGAAGATGCGGCGAGACTTT	GAGGCCAAACCTTGGTGAGA
hNRF1	CGCTGTAAAGCGCCATAGTG	GGAGTGATGTCCGCACAGAA
hNRF2	CTTCATCTAGTTGTAAGTGGG	AGAATAAAGTGGCTGCTCAG
hMYH6	GAGGAGCAAGCCAACACCAA	GTGTCACTCCTCATCGTGCAT
hMYL3	GCCCTAAGGAGGTCGAGTTT	CACTGCCCGTAGGTGATCTT
hTTN	GGACTTCATAGCGCCGAAGT	CCAGTGCCTTCTTTTCGGA
hNEBL	CAGAGCACCAGAGACGTCAG	TCCTCAAATACAGGGACCCTCA
hACTC1	TATGCTTCTGGCCGTACCAC	CAAAGGAGTAGCCACGCTCA
hTNNT2	AGACAGAGCGGAAAAGTGGG	GTCGAACTTCTCTGCCTCCAA
hTNNI3	GATGCGGCTAGGGAACCTC	TGCAATTTTCTCGAGGCGGA
hANK2	GCAGCTCAGAAAAGCGACAG	CACGGAGGAAGCTTGCATTG
hKCNQ1	GCGTCTCCATCTACAGCACG	GAAGTGGTAAACGAAGCATTTC
hKCNH2	TTCCTGGACACCATCATCCG	TCGTTGCAGTAGATGACGGC
hKCNJ2	GTCCGAGGTCAACAGCTTCA	ATGATGCAGCCCACGATTGA
hCACNA2D2	TTCTCTTTGTGGTGGCCGAG	TGCACTAGCTCACACTGCTC
hCACNA1G	GAACCGTCCTGCTCTCTAGC	CAGACTTCCGCACAGTCAGT
hSCN2B	AAGCCATAAGCACTGGGGAC	TGACCCTGTTGTATTGCCCC
hSCN5A	CGCAAGGAAACACGGTTTGA	GCTGGGATTCTGCTTGCT
hTGFB1	GAGTGTGGAGACCATCAAGGA	CTGTTTTAGCTGCTGGCGAC
hSMAD2	GCAAGCCACGCTAGGAAAAC	TACAGGTTGCATGGTCTGGC
hSMAD4	TACAGGTTGCATGGTCTGGC	CACCCTGCCCCACAAAATG
hPOSTN	GAGACACACCCGTGAGGAAG	CACTGAGAACGCCTTCCCTT
hFBN1	CCTATGCCGAGGTGGTGT	TGTCGATACACGCGGAGATG
hGDF15	GCAAGAACTCAGGACGGTGA	TGGAGTCTTCGGAGTGCAAC
hCKM	AGAGTCCTGCTCCCTCACTC	AGGATGGAGCCCATTGGTTG
hGAPDH	CCCCTCTGCTGATGCCCCCA	TGACCTTGGCCAGGGGTGCT
rNfe2l2	GCCCTGGATATTCCAGCC	TCTCAGCCTGCTGCTTGT

rNrf1	TACAAGGCGGGGGACAGATA	TGCATGAACTCCATCTGGGC
rGapdh	CCCAGCCCAGCAAGGAT	TGTTGTTATGGGGTCTGGGAT

Tabla 5. Lista de los cebadores empleados para RT-qPCR.

11.4 Extracción de miARN

La extracción de miARN se llevó a cabo de manera similar a la extracción de ARN. Las células se mantuvieron en frío, se realizó un lavado con PBS y se añadieron 700 µl del tampón de lisis QIAzol (Qiagen) a cada pocillo. Este protocolo se realizó en una cabina de extracción de gases debido a la toxicidad del QIAzol. El homogeneizado de células en QIAzol se recogió en tubos Eppendorf y puede almacenarse a -80°C durante varios meses antes de proceder a la purificación del miARN. A continuación, se añadieron 140 µl de cloroformo a cada tubo, se agitaron vigorosamente en vórtex durante 15 s, se incubaron 2-3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 15 min a 12000 x *g* a 4°C. Esto produce la separación de la muestra en tres fases: una fase orgánica de color rosa abajo, una interfase blanca y una fase acuosa transparente arriba. Se recogió la fase acuosa (aprox. 300 µl) y se mezcló con 1,5 volúmenes de etanol 100%. Después, se procedió a la purificación del miARN utilizando las columnas del kit comercial miRNeasy micro kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

11.5 Retrotranscripción de miARN

La transcripción inversa de miARN se realizó con el miRCURY LNA Universal RT miRNA PCR Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf utilizando 2 µl del miARN purificado anteriormente en todas las muestras. Se utilizó un ciclo de temperatura de 60 min a 42°C seguido de una incubación de 5 min a 95°C y, finalmente, se mantuvo a 4°C. El producto de la reacción se almacenó a -20°C.

11.6 RT-qPCR de miARN

Para estudiar los niveles relativos de miARN de las células tras los distintos tratamientos se realizó una RT-qPCR empleando el kit miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit y cebadores específicos de miARN de la marca miRCURY LNA miRNA PCR Assays (todo ello de Qiagen). Para cada reacción de la RT-qPCR se utilizaron 4 µl del ADNc obtenido en el paso anterior diluido 1:80, 5 µl de miRCURY SYBR Green Master Mix y 1 µl de cebador. Las reacciones de RT-qPCR se hicieron por triplicado para cada muestra y miARN estudiado. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos en un termociclador Viia 7 Real-Time PCR siguiendo el protocolo detallado en la tabla 4.

11.7 Extracción de proteína

La extracción de proteínas de las células también se llevó a cabo en frío poniendo las placas de cultivo en una bandeja con hielo. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se lisaron con tampón RIPA. El lisado celular se recogió en tubos eppendorf y estos se centrifugaron a 12000 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante con las proteínas se pasó a nuevos tubos y los restos celulares se descartaron. Las muestras se almacenaron a -20°C.

11.8 Cuantificación de proteínas mediante ensayo BCA

Para determinar la concentración de proteína en las muestras extraídas anteriormente se llevó a cabo un ensayo BCA empleando el Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Cuando la proteína reacciona con los reactivos del BCA dan lugar a un producto coloreado que puede ser cuantificado por colorimetría. Para realizar el ensayo se mezclaron previamente los reactivos B y A del kit con una ratio de 1:50. A continuación, se añadieron 10 µl de cada muestra de proteína en RIPA a 190 µl de la mezcla de reactivos de BCA en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 30 min a 37°C. También se realizó la reacción para una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA) de concentraciones conocidas que van de 20 a 2000 µg/ml. Tras el tiempo de incubación, se determinó la absorbancia de las muestras y de la curva patrón a 550 nm en un lector de placas Halo LED 8. Se representaron la absorbancia de la curva patrón frente a la concentración de proteína y se obtuvo una recta en la

cual se interpolaron las absorbancias de las muestras para determinar la concentración de proteína.

11.9 Western blot

El Western Blot es un inmunoensayo basado en la reacción antígeno-anticuerpo que permite detectar de forma específica una proteína determinada en una muestra biológica. La técnica consta de tres pasos:

- La separación de las proteínas por sus pesos moleculares mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.
- La transferencia de las proteínas a una membrana.
- El marcaje de las proteínas que se quieren estudiar con un anticuerpo primario y uno secundario conjugado con una molécula que permite su detección.

11.9.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilfulfato sódico (SDS-PAGE, por Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis) permite la separación de las proteínas a través de una matriz porosa al aplicar un campo eléctrico constante. El uso de SDS, un detergente aniónico, ayuda a desnaturalizar las proteínas y les aporta densidad de carga negativa. De este modo, cuando se aplica un campo eléctrico en el gel de poliacrilamida, las proteínas solo migran en función de su peso molecular. Los geles se formaron utilizando una solución de acrilamida 30%/ bisacrilamida 0,8% (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). La polimerización de la acrilamida se llevó a cabo utilizando las recetas mostradas en la tabla 6. El porcentaje de acrilamida final del gel determinará el tamaño de los poros de la matriz, de modo que cuanto mayor sea, menor será el tamaño de poro y más tiempo les costará a las proteínas migrar por él. En este trabajo se emplearon geles divididos en dos fases. La primera fase (*stacking*) es un gel con una concentración de poliacrilamida baja (5%) que permite que las proteínas migren rápidamente y se concentren en un punto. La segunda fase (*running*) es donde se produce la separación de las proteínas. Los geles running con porcentaje alto de acrilamida (10-15%) se utilizan para separar proteínas de bajo peso molecular y los de porcentaje bajo (6-8%) se usan para separar las de elevado peso molecular.

Geles de poliacrilamida			
Stacking (gel 6%)		Running (gel 10%)	
Agua MQ	6,3 ml	Agua MQ	7,93 ml
Tris 1 M pH 6,8	1,5 ml	Tris 1,5 M pH 8,8	5 ml
Acrilamida 29:1 30%	2 ml	Acrilamida 29:1 30%	6,67
SDS 10%	100 µl	SDS 10%	200 µl
APS 10%	100 µl	APS 10%	200 µl
TEMED	10 µl	TEMED	8 µl
Volumen total	10 ml	Volumen total	20 ml

Tabla 6. Composición de los geles de poliacrilamida

Para realizar la electroforesis, 30 µg de las muestras de proteína se mezclaron con tampón de carga Laemmly 4x (Bio-Rad) suplementado con β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). Después, las muestras se incubaron a 95°C durante 5 min para desnaturar las proteínas y se cargaron en los pocillos del gel. También se añadió un marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BioRad) para determinar el tamaño de las proteínas. La electroforesis se llevó a cabo en un tampón de running (25 mM Tris, 190 mM de glicina y 0,1% de SDS) con amperaje constante de 50 mA.

11.9.2 Transferencia a membrana de PVDF

Tras separar las proteínas estas se transfirieron del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P; Millipore) previamente activada con metanol 100% durante 15 s, 2 min en agua MQ y 15 min en tampón de transferencia (0,25 M Trizma Base, 2 M glicina y 20% de metanol). La transferencia se realizó en el mismo tampón con amperaje constante (250 mA) durante 3 h en frío.

11.9.3 Inmunodetección

Tras la transferencia, las membranas se bloquearon con una solución de bloqueo formada por leche en polvo desnatada al 5% disuelta en tampón salino tris (TBS,

compuesto de 50 mM Tris-HCl y 150 mM NaCl a pH 7,6) durante 1 h en agitación suave a temperatura ambiente. Esto se realiza para evitar las uniones inespecíficas entre los anticuerpos y la membrana. Después, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios contra las proteínas que se quieren detectar diluidos en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con TBS durante 10 min a temperatura ambiente en agitación suave. A continuación, se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) en agitación suave a temperatura ambiente durante 1,5 h y se lavaron 3 veces con TBS. En la tabla 7 se muestra una lista con los anticuerpos empleados. Finalmente, las membranas se revelaron con el kit SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) en un revelador Amersham Imager 600 (GA Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.) La expresión relativa de las proteínas se determinó por densitometría utilizando el programa informático ImageJ.

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti-caspasa 3	Conejo	1/500	Cell Signaling Technology®	#9662
Anti-caspasa 3 activa	Conejo	1/500	Cell Signaling Technology®	#9664
Anti-bcl-2	Conejo	1/200	Cell Signaling Technology®	#4223
Anti-bax	Conejo	1/500	Cell Signaling Technology®	#2772
Anti-p-histona γ -H2AX	Ratón	1/1000	Merck Millipore	05-636-200
Anti-catalasa	Conejo	1/200	Cell Signaling Technology®	#12980
Anti-SOD1	Conejo	1/500	Cell Signaling Technology®	#37385
Anti-p-YAP	Conejo	1/500	Cell Signaling Technology®	#13008
Anti-YAP	Conejo	1/500	Cell Signaling Technology®	#14074
Anti-Smad2	Conejo	1/500	Fisher Scientific	16860344
Anti-tubulina	Ratón	1/4000	Sigma-Aldrich	T5168
Anti-gapdh	Conejo	1/1000	Cell Signaling Technology®	#5174

Anticuerpos secundarios				
Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti-IgG de conejo	Cabra	1/5000	Dako	P0448
Anti-IgG de ratón	Conejo	1/5000	Sigma-Aldrich	A9044

Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para Western Blot.

12. Modelo experimental de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina *in vivo*

12.1 Animales

En el estudio se emplearon ratas Wistar de 200-250 g (Charles River Laboratories Inc. Willmington, MA, EE. UU.). El número inicial de ratas incluida en el estudio fue de 20. La mortalidad debida al tratamiento con doxorubicina fue del 20% aproximadamente.

12.2 Tratamiento con doxorubicina y administración *in vivo* del miR-4732-3p

Las ratas se dividieron en tres grupos experimentales: control, DOX y DOX+miR-4732-3p. Al grupo DOX se le administraron 7 inyecciones intraperitoneales (1 a la semana) de doxorubicina (D2975000, Merck) a una dosis de 2 mg/kg, dando lugar a una dosis acumulada de 14 mg/kg. El grupo DOX+miR-4732-3p recibió el mismo tratamiento con doxorubicina y, además, el miR-4732-3p encapsulado en una emulsión liposomal. Para preparar la emulsión, se mezclaron 16 µl del Mimic-4732 con 8,5 µl de Maxsupressor *in vivo* RNA-LANCER-II lipidic Reagent (Cosmo Bio Co. Ltd, Tokio, Japón). La formulación lipídica se inyectó a través de la vena de la cola en la semana 2 y 4 después de la primera inyección de doxorubicina. La dosis final de Mimic-4722 fue de 70 µg/rata.

12.3 Ecocardiografía en ratas

El ecocardiograma transtorácico es una prueba diagnóstica de imagen empleada para estudiar el funcionamiento del corazón. Para evaluar la función cardíaca de las ratas se realizaron ecocardiografías transtorácicas bajo anestesia inhalatoria (Sevofluorano™) usando un sistema ecocardiográfico (General Electrics, Milwaukee, WI, EE. UU.) equipado con una sonda de 10 MHz como se describió anteriormente²³¹. Las medidas se tomaron antes del tratamiento con doxorubicina y tras 6 semanas del tratamiento con doxorubicina. La ecocardiografía en modo M y en dos dimensiones (2D) se realizó a nivel de los músculos papilares en la vista del eje corto paraesternal. Los parámetros funcionales se registraron durante cinco ciclos cardíacos consecutivos y se calcularon siguiendo la metodología establecida²³². Se tomaron medidas del ventrículo izquierdo (LV) en fin de diástole (LVDd) y fin de sístole (LVDs), el grosor de la pared anterior (AWT) y la posterior (PWT) en diástole y sístole, el área de fin de diástole (EDA) y de sístole (ESA). El cambio porcentual de área (CAP) se calculó con la siguiente fórmula: $CAP = [(EDA-ESA)/EDA] \cdot 100$. La fracción de acortamiento (FA) se calculó como $FA = [(LVDd-LVDs)/LVDd] \cdot 100$.

12.4 Sacrificio de los animales y fijación por perfusión

Las ratas se sacrificaron a las 6 semanas de la primera inyección de doxorubicina y se extrajeron los corazones. En primer lugar, se inyectó al animal con 0,5 ml de tiopental sódico, que actúa como anestésico, y 0,1 ml de fentanilo, que actúa como analgésico, ambos por vía intraperitoneal. Se comprobó que la rata estaba completamente anestesiada por la pérdida del reflejo pedal (no retira la pata trasera al apretarla con unas pinzas). Cuando la rata estaba completamente anestesiada y había dejado de responder a los estímulos se procedió a la apertura de la cavidad torácica para dejar expuesto el corazón. Se inyectó una palometa en la vena cava y otra en el ventrículo izquierdo. Por ambas palometas se inyectaron 5 ml de una solución de cloruro de cadmio 62 mM y cloruro de potasio 1,5 M para detener el corazón en diástole. A continuación, se retiró la palometa de la vena cava y se cortó. Seguidamente, se inyectaron 10 ml de suero salino por la canulación del ventrículo izquierdo para lavar el corazón y luego 5 ml de PFA al 2%. La palometa del ventrículo izquierdo se retiró, se introdujo una nueva por la aorta y por ella se perfundió PFA al 2% durante 15 min utilizando una bomba de perfusión a velocidad 4,3 ml/min. Después, se extrajo el

corazón, se lavó con PBS, se cortó la parte superior de la aurícula para favorecer la entrada de PFA y se dejó en PFA 2% en agitación a 4°C durante toda la noche para finalizar la fijación. Al día siguiente se realizaron 5 lavados con PB 0,1 M durante 15 min.

12.5 Histología

12.5.1 Inclusión en parafina y corte de los corazones

Una vez se han fijado los corazones, estos se incluyen en parafina. El proceso sustituye el agua del tejido para reemplazarla por un medio líquido (la parafina) que solidifica a temperatura ambiente. Esto proporciona al tejido la consistencia y homogeneidad necesaria para obtener secciones muy finas mediante un microtomo. El protocolo que se empleó fue el siguiente:

- Etanol al 70% durante toda la noche en agitación (225 rpm) a 4°C.
- Etanol al 70% durante 1 h en agitación a temperatura ambiente.
- Etanol al 96% durante 1 h en agitación a temperatura ambiente (2 veces).
- Etanol al 100 % durante 1 h en agitación a temperatura ambiente (2 veces).
- Xilol durante 30 min en agitación a temperatura ambiente (2 veces).
- Mantener el tejido en parafina líquida durante una hora en estufa a 60°C.
- Cambiar a otra cubeta con parafina “limpia” durante toda la noche en la estufa a 60°C.
- Al día siguiente se forman los bloques de parafina con los corazones dejando que solidifiquen en una placa fría. Los bloques se pueden almacenar a temperatura ambiente durante meses antes de cortarlos.

Una vez obtenidos los bloques, estos se cortaron con un microtomo obteniendo secciones de 5 µm de grosor. Los cortes se recogieron en portaobjetos recubiertos de gelatina-alumbre para su posterior tinción.

12.5.2 Desparafinación del tejido

Para poder realizar una tinción acuosa o inmunofluorescencia los cortes se tienen que desparafinar, ya que la parafina no se puede mezclar con el agua. Para ello se siguió el siguiente protocolo:

- Mantener los cortes en una estufa a 60°C durante 25 min.
- Realizar dos lavados con xilol durante 5 min a temperatura ambiente.
- Realizar dos lavados con etanol al 100% durante 5 min a temperatura ambiente.
- Realizar dos lavados con etanol al 96% durante 5 min a temperatura ambiente.
- Realizar dos lavados con etanol al 70% durante 5 min a temperatura ambiente.
- Los cortes se mantuvieron en PBS a 4°C hasta el momento de realizar la tinción.

12.5.3 Tricrómico de Masson

La tinción tricrómica de Masson es una tinción que permite visualizar las fibras de colágeno I. En esta tinción las fibras de colágeno se tiñen de azul, mientras que el tejido muscular se tiñe de rojo. Esto permite cuantificar el porcentaje de fibrosis del corazón cuantificando el área azul que corresponde al colágeno. El protocolo que se empleo fue el siguiente:

- Introducir los portaobjetos con los cortes desparafinados en una cubeta con solución de Bouin (Sigma-Aldrich) a 56°C durante 15 min.
- Lavar con agua corriente hasta enfriar las muestras.
- Incubar 5 min con hematoxilina férrica de Weigert (Sigma-Aldrich) en oscuridad.
- Lavar los cortes en tres cubetas con agua corriente caliente de mayor a menor temperatura.
- Aclarar con agua destilada.
- Incubar 2 min con fucsina ácida-escarlata de biebrich (Sigma-Aldrich).
- Aclarar con agua destilada.
- Incubar 15 min con ácido fosfomolibdico (Sigma-Aldrich) en oscuridad.
- Incubar 1 min con azul de anilina (Sigma-Aldrich).
- Incubar 1 min con ácido acético al 1%.
- 20 pases de etanol al 70%.
- 20 pases de etanol al 96%.
- 20 pases de etanol al 100%.
- Mantener en xilol hasta el montaje de las muestras.

Las muestras se visualizaron con un microscopio Leica DM6000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) y el porcentaje de fibrosis se determinó utilizando el programa informático ImageJ.

12.5.4 Rojo Sirio

El rojo sirio es otra de las tinciones utilizadas para cuantificar fibrosis en los cortes de corazón. Esta tinción tiñe el colágeno de color rojo intenso y los núcleos y citoplasmas de color amarillo rojizo. Se empleó el siguiente protocolo:

- Para preparar la tinción de rojo sirio (Sigma-Aldrich):
 - Disolver 4 g de pícrico saturado en 90 ml de agua destilada en agitación 30 min.
 - Disolver 0,1 g de direct red en 10 ml de agua.
 - Mezclar ambas disoluciones y esperar 48 h.
 - Filtrar antes de usar.
- Incubar los cortes con la tinción de rojo sirio durante 30 min a temperatura ambiente.
- Realizar 2 lavados en agua acética (0,5% de ácido acético en agua destilada) de 5 min.
- Realizar 2 lavados en etanol 100% de 5 min cada uno.
- Realizar 2 lavados en xilol y mantener en xilol hasta el montaje.

Las muestras se visualizaron con un microscopio Leica DM6000 y el porcentaje de fibrosis se determinó utilizando el programa informático ImageJ.

12.5.5 Inmunofluorescencia en tejido

Para realizar la inmunofluorescencia en los cortes de tejido primero se realizó un des-enmascaramiento antigénico sumergiendo los portaobjetos en tampón citrato 10 mM a 95°C durante 25 minutos. Para reducir la temperatura, los cortes se pasaron por 3 cubetas con agua corriente. A continuación, se siguió el mismo protocolo de inmunofluorescencia empleado en las células. Los cortes se bloquearon con solución de bloqueo y se incubaron con los anticuerpos primarios (tabla 8) durante toda la noche. Al día siguiente se incubaron con los anticuerpos secundarios (tabla 8) y DAPI y se

montaron con FluorSave™. Finalmente, los cortes se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM2500 y se analizaron con ImageJ.

Anticuerpos primarios				
Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia
Anti-4-HNE	Ratón	1/100	Abcam	ab48506
Anti-caveolina-1	Conejo	1/100	Cell Signaling Technology®	#3238
Anti-periostina	Conejo	1/200	Proteintech	19899-1-AP
Anticuerpos secundarios				
Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia
Alexa Fluor® 488 anti-ratón	Cabra	1/200	Thermo Fisher Scientific	A11001
Alexa Fluor® 555 anti-conejo	Cabra	1/200	Thermo Fisher Scientific	A27039

Tabla 8. Anticuerpos empleados en inmunofluorescencia en cortes de corazón.

12.5.6 Cuantificación de la apoptosis por TUNEL

La tinción de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) es un método para detectar células en apoptosis. La tinción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cortes de corazón se incubaron en solución de bloqueo y permeabilización durante 1 h y, después, se incubaron con la mezcla de reactivos de TUNEL del *in situ* cell death detection kit TMR red (Roche, Basel, Suiza) durante 1 h a 37°C en oscuridad. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS, se incubaron con DAPI 200 ng/ml durante 10 min en oscuridad y se lavaron 3 veces con PBS. Finalmente, se montaron con el reactivo FluorSave™. Los cortes se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM2500 y se analizaron con ImageJ.

12.5.7 Medida del área transversal de los cardiomiocitos mediante tinción con WGA

Para medir el área transversal de los cardiomiocitos se realizó una tinción con aglutinina de germen de trigo (WGA), ya que esta se une a las glicoproteínas del sarcolema, marcando el contorno de los cardiomiocitos. Los cortes del corazón se tiñeron con WGA 5 µg/ml (WGA Texas Red™ conjugate, Thermo Fisher Scientific) en HBSS durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS, se tiñeron con DAPI 200 ng/ml durante 10 min en oscuridad y se lavaron 3 veces con PBS. Después se montaron con FluorSave™ y finalmente, se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM2500. Las imágenes se analizaron con el programa informático ImageJ.

13. Análisis de ontología génica de genes diana del miR-4732-3p

Se estudiaron los posibles genes diana del miR-4732-3p *in silico*. Los términos de ontología génica (GO) enriquecidos para los genes diana del miR-4732-3p fueron obtenidos a partir de miRWalk y se consideraron significativos para p-valor < 0,05²³³. Los términos GO seleccionados y sus intersecciones fueron representados con un diagrama UpSet. Empleando mirDIP 4.1²³⁴ se obtuvo un conjunto de genes diana predichos para el miR-4732-3p y estos fueron analizados con GeneTrail²³⁵ para identificar miARNs con genes diana similares. Los miARNs que tuvieron genes validados significativamente enriquecidos fueron seleccionados para un análisis de interactoma.

14. Análisis de interactoma

Se emplearon bloques funcionales a partir de los procesos biológicos de la ontología génica para un análisis con el Cytoscape Software v3.7.2 (www.cytoscape.org/). Las imágenes del interactoma se construyeron empleando miARNs detectados en miR-TarBase. Se determinó una significancia de 0.05 y los bloques funcionales se consideraron enriquecidos si su p-valor corregido era < 0,05.

15. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se representaron como la media \pm la desviación estándar (SD). Los análisis se realizaron con el programa informático GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). La normalidad de la distribución de los datos se analizó con el test de Kolmogorov-Smirnov. Para la comparación de la media de una variable en dos grupos con distribución normal se utilizó el test de la t de Student, pareada o no pareada en función del diseño experimental. Cuando la distribución no ha sido normal se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Para la comparación de la media de una variable entre tres o más grupos experimentales se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Para realizar comparaciones entre parejas de grupos experimentales después de realizar el ANOVA se realizó el test de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un $p < 0,05$ con un intervalo de confianza del 95%.

Resultados

1. Selección de pacientes oncológicos pediátricos con cardiotoxicidad inducida por antraciclinas y derivación de hiPSC específicas de paciente

La cardiotoxicidad temprana como consecuencia del tratamiento con antraciclinas es rara en pacientes pediátricos. Por este motivo, se decidió estudiar el efecto de la doxorrubicina en cardiomiocitos diferenciados de hiPSC derivadas de pacientes oncológicos pediátricos que experimentaron cardiotoxicidad temprana como consecuencia de su tratamiento con antraciclinas. En este estudio se reclutaron dos pacientes con estas características, de 7 y 14 años de edad, gracias a la colaboración con el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona y el Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Las hiPSC se generaron en el Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB). Para ello, se obtuvieron muestras de sangre de los pacientes y se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las PBMC se reprogramaron mediante un sistema no integrativo que utiliza como vector el virus Sendai (Figura 10). Mediante la sobreexpresión de los factores de reprogramación Klf4, Oct3/4, Sox2 y cMyc se obtuvieron hiPSC específicas de los pacientes oncológicos pediátricos con cardiotoxicidad temprana inducida por antraciclinas. Las líneas de hiPSC obtenidas se llamaron Ct PBiPS1-SV4F-1 (CTX1) y Ct PBiPS2-SV4F-1 (CTX2). Con fines comparativos, se utilizaron dos líneas de hiPSC control llamadas FiPS CTRL1-SV4F-7 (CTRL1) y FiPS CTRL2-SV4F-1 (CTRL2) procedentes de niños sin ninguna patología conocida. La información relativa al registro, depósito y caracterización de estas líneas de hiPSC se puede encontrar en la página web <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/BIOBANCOS/BNLC/Paginas/LineasiPS.aspx>.

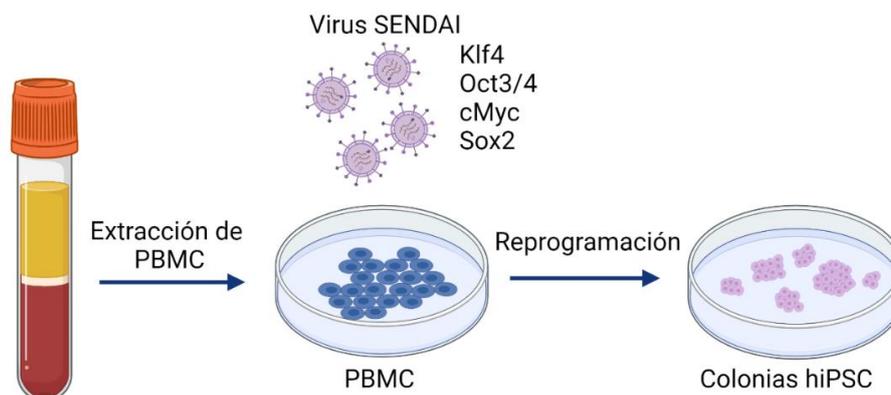


Figura 10. Esquema del proceso de reprogramación de PBMC para derivar hiPSC.

2. Diferenciación de las hiPSC a cardiomiocitos

Las hiPSC son células con el potencial de diferenciarse a cualquier tipo celular adulto. En este trabajo las hiPSC se han diferenciado a cardiomiocitos para estudiar la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina *in vitro*. La diferenciación se llevó a cabo mediante la modulación de la vía de señalización de WNT²³⁰ (Figura 11A). Para ello, en el día 0 de la diferenciación las células se tratan con el activador de la vía de WNT CHIR99021 para inducir mesodermo. El día 2 de la diferenciación se utiliza el inhibidor de la vía de WNT IWP-4 para inducir linaje cardíaco. Durante los primeros cuatro días de la diferenciación se observa mucha muerte celular en el cultivo (Figura 11B). A partir del día 6 de diferenciación aproximadamente, se obtienen los primeros progenitores cardíacos. Alrededor del día 8 se observa un cambio morfológico importante, con haces de cardiomiocitos que se empiezan a contraer de manera sincronizada (Figura 11B). Entre el día 11 y el día 16 las células son sometidas a una selección metabólica utilizando un medio de cultivo sin glucosa, y lactato como fuente de energía, ya que en estas condiciones solo pueden sobrevivir células con un metabolismo cardíaco. Al final de la diferenciación los cardiomiocitos están densamente empaquetados sobre la superficie de la placa de cultivo. Alrededor del día 18 tras el inicio de la diferenciación, los cardiomiocitos se disgregan y se vuelven a sembrar a una menor densidad para obtener una monocapa de células en la que se realizaran los experimentos.

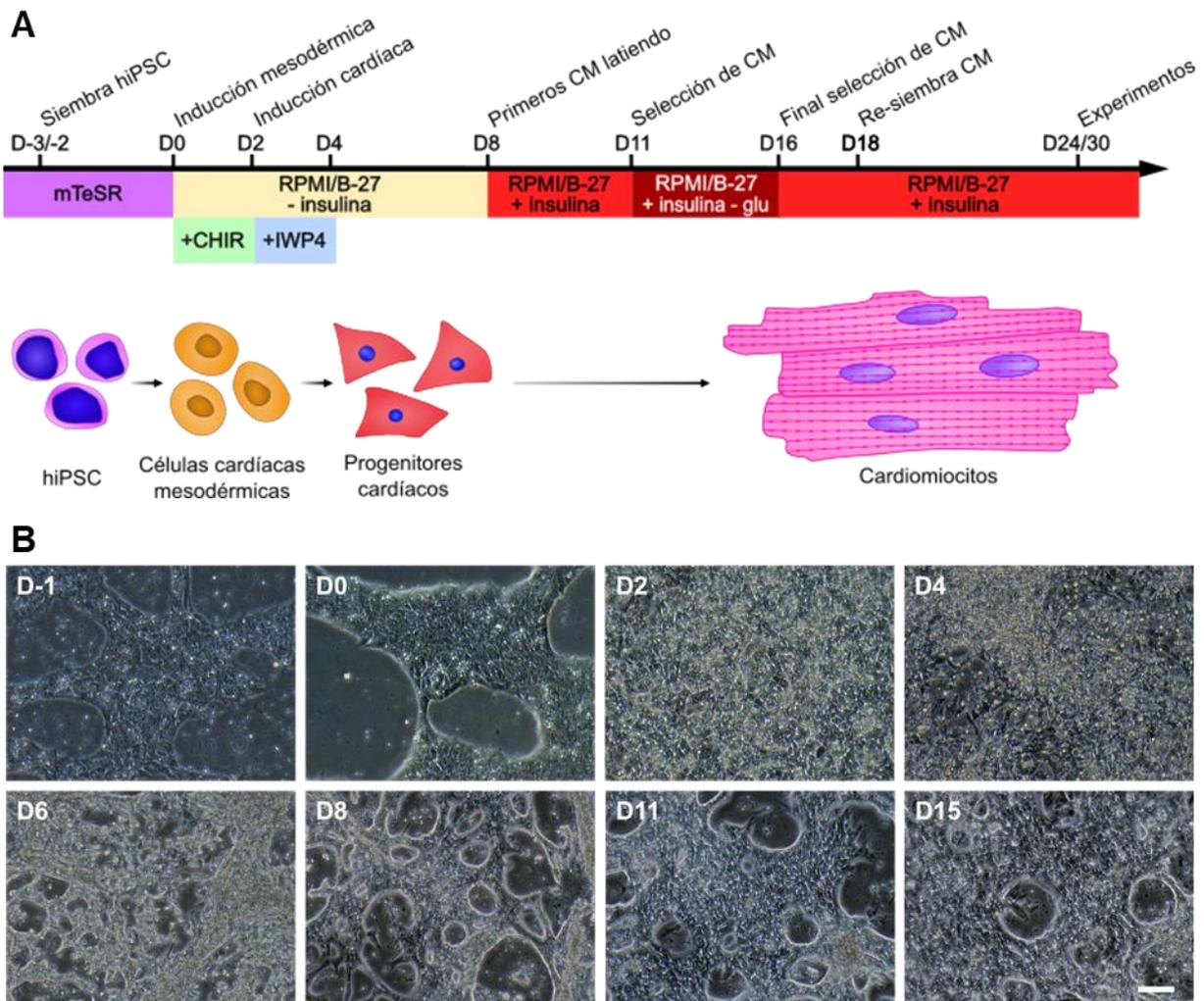


Figura 11. Diferenciación a hiPSC-CM. **A)** Esquema del proceso de diferenciación a hiPSC-CM. **B)** Registro fotográfico del proceso de diferenciación. En las fotos a D-1 y D0 las células todavía son hiPSC. Del D8 en adelante las fotos muestran la morfología característica de los hiPSC-CM sin disgregarse (escala = 100 μ M).

Para comprobar la eficacia de la diferenciación al linaje cardíaco, se analizó, mediante citometría de flujo, la expresión de dos marcadores específicos de los cardiomiocitos: la cadena pesada de la miosina (MHC) y la troponina cardíaca I (cTnI). Se observó que más del 90% de las células eran positivas para ambos marcadores (Figura 12A). Además, se comprobó, por inmunofluorescencia, la expresión y distribución de dos proteínas sarcoméricas, la α -actinina sarcomérica (SAA) y la troponina cardíaca T (cTnT), observándose el característico patrón estriado del músculo cardíaco (Figura 12B). Por último, se analizó la expresión de dos genes marcadores de pluripotencia (*OCT4* y *SOX2*) y dos genes marcadores de cardiomiocitos (*MYH7* y *TNNT2*) durante el tiempo que dura la diferenciación (Figura 12C). Al principio de la diferenciación (día

0), *OCT4* y *SOX2* están altamente expresados, mientras que no hay expresión de *MYH7* ni de *TNNT2*. Desde el día 5 de diferenciación en adelante ya no hay expresión de *OCT4* ni de *SOX2*, indicando que las células ya han perdido su estado pluripotente. A partir del día 5 se comienza a expresar *TNNT2*, indicando que las células se están diferenciando a cardiomiocitos, y a partir del día 11 comienza a expresarse el otro marcador cardíaco, *MYH7*. En el día 18 de la diferenciación, momento en el que los cardiomiocitos se disgregan y siembran para futuros experimentos, ambos marcadores cardíacos se encuentran altamente expresados.

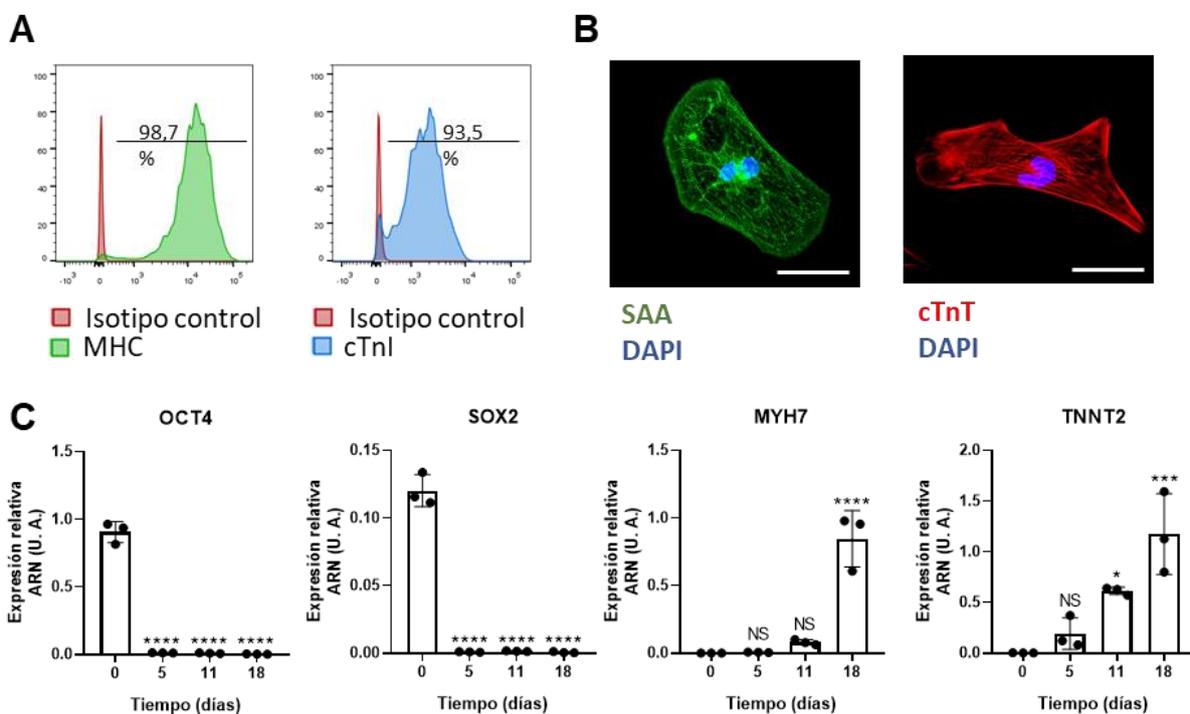


Figura 12. Caracterización de los hiPSC-CM. **A)** Histogramas representativos de las tinciones para los marcadores cardíacos MHC y cTnI. **B)** Imágenes representativas de hiPSC-CM teñidos con anticuerpos contra la α -actinina sarcomérica y la troponina cardíaca T. **C)** Expresión de los genes marcadores de pluripotencia *OCT4* y *SOX2* y marcadores cardíacos *MYH7* y *TNNT2* a lo largo del proceso de diferenciación. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, NS = no significativo.

3. Caracterización de hiPSC-CM de pacientes pediátricos que experimentaron cardiotoxicidad temprana frente al daño por doxorubicina

Una vez establecido el protocolo de diferenciación a hiPSC-CM, las líneas de hiPSC-CM CTX se caracterizaron frente al daño por doxorubicina para comprobar si eran más susceptibles a la misma y podrían constituir un buen modelo para estudiar los mecanismos de cardiotoxicidad de la doxorubicina o como modelo *in vitro* para probar agentes cardioprotectores.

3.1 Los hiPSC-CM CTX tienen unos mayores niveles de citotoxicidad inducida por doxorubicina y apoptosis que los hiPSC-CM CTRL

Para caracterizar la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina en los hiPSC-CM CTRL y CTX primero se probaron diferentes dosis de doxorubicina (0-20 μM) con un tiempo de exposición de 48 h, y se determinó la viabilidad relativa de las células mediante el ensayo CCK8. Se comprobó que a partir de la dosis de 1 μM de doxorubicina los hiPSC-CM CTX tuvieron una menor viabilidad que los hiPSC-CM CTRL (Figura 13A). Utilizando este rango de dosis se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), es decir, la concentración mínima de doxorubicina que produjo un 50% de reducción de la viabilidad celular, para las líneas de hiPSC-CM CTRL y CTX. La IC_{50} de los hiPSC-CM CTRL fue de 2,26 μM , significativamente superior que la IC_{50} de los hiPSC-CM CTX, de 0,9 (Figura 13B). Para futuros experimentos se seleccionó el tratamiento con doxorubicina de 1 μM durante 48 h. También se llevó a cabo un ensayo lactato deshidrogenasa (LDH). Este ensayo mide la actividad LDH liberada en el medio de cultivo como consecuencia del daño en la membrana plasmática, en este caso causado por la doxorubicina. Se observó que la actividad LDH en el medio de cultivo de los hiPSC-CM CTX era significativamente mayor que en el medio de los hiPSC-CM CTRL (Figura 13C). Además, en imágenes de microscopía de contraste de fases de los hiPSC-CM CTX tratados con doxorubicina se puede observar un mayor número de células muertas que en los hiPSC-CM CTRL, también tratados (Figura 13D). También se determinó el porcentaje de células apoptóticas tras el tratamiento con doxorubicina mediante

una tinción con anexina-V-FITC, una proteína que es capaz de unirse a la fosfatidilserina, un fosfolípido que en condiciones normales se encuentra en la hemimembrana interna de las células, pero se transloca a la hemimembrana externa cuando las células entran en apoptosis. Se determinó que el porcentaje de células en apoptosis de los hiPSC-CM CTX tratados con doxorubicina era significativamente superior al de los hiPSC-CM CTRL (Figura 13E).

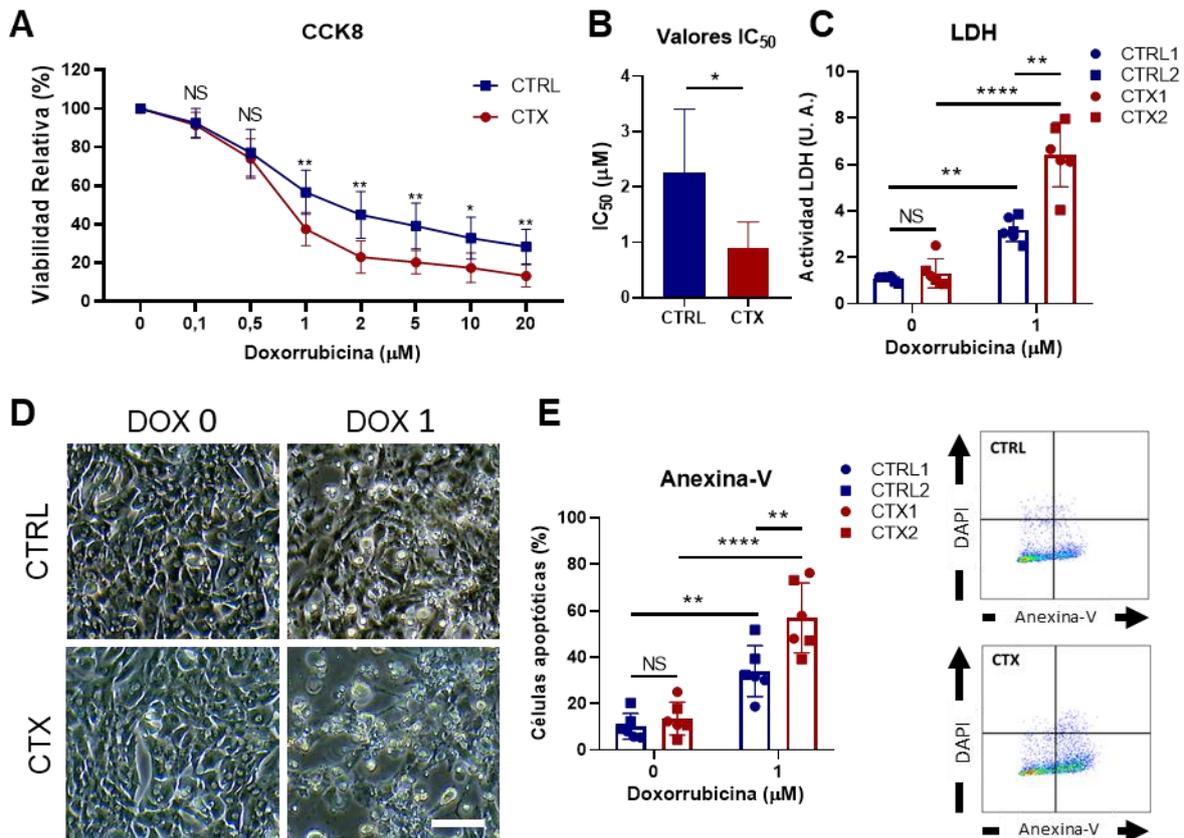


Figura 13. Efecto de la doxorubicina sobre la viabilidad y apoptosis de los hiPSC-CM CTRL y CTX. **A)** Curvas de viabilidad de los hiPSC-CM tras ser expuestos a dosis crecientes de doxorubicina. **B)** Concentración de doxorubicina que provoca una reducción de la viabilidad de los hiPSC-CM del 50% (IC₅₀). **C)** Actividad LDH en el medio de cultivo de los hiPSC-CM CTRL y CTX tras el tratamiento con doxorubicina. **D)** Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases de cardiomiocitos CTRL y CTX tratadas y sin tratar con doxorubicina. Se puede observar una mayor muerte celular y debris en los cardiomiocitos CTX tratados con doxorubicina comparados con los CTRL. **E)** Porcentaje de células apoptóticas de los hiPSC-CM CTRL y CTX tratados y sin tratar con doxorubicina. A la derecha se muestran imágenes representativas de las citometrías de flujo utilizadas para cuantificar los niveles de apoptosis. Los datos han sido representados como la media ± S. D. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, NS = no significativo.

Se quiso estudiar con mayor profundidad el efecto de la doxorrubicina sobre la apoptosis de los hiPSC-CM CTX y CTRL. En primer lugar, se estudió la actividad de las caspasas en los hiPSC-CM CTRL y CTX, ya que estas son las proteínas efectoras de la apoptosis. Se observó que la actividad caspasa 3/7 de los hiPSC-CM CTX tras el tratamiento con doxorrubicina era superior que en los hiPSC-CM CTRL, indicando unos niveles mayores de apoptosis en los cardiomiocitos CTX (Figura 14A). También se determinaron, por Western Blot, los niveles de procaspasa 3 y caspasa 3 activa de los hiPSC-CM CTRL y CTX (Figura 14B-D), observándose niveles superiores de procaspasa 3 y niveles muy elevados de caspasa 3 activa en los hiPSC-CM CTX tratados con doxorrubicina comparados con los niveles de caspasa 3 activa en los hiPSC-CM CTRL. Por último, se estudió por Western Blot la ratio entre la proteína pro-apoptótica bax y la proteína anti-apoptótica bcl-2, observándose un ratio significativamente superior en los hiPSC-CM CTX tratados con doxorrubicina comparados con los CTRL (Figura 14B, E).

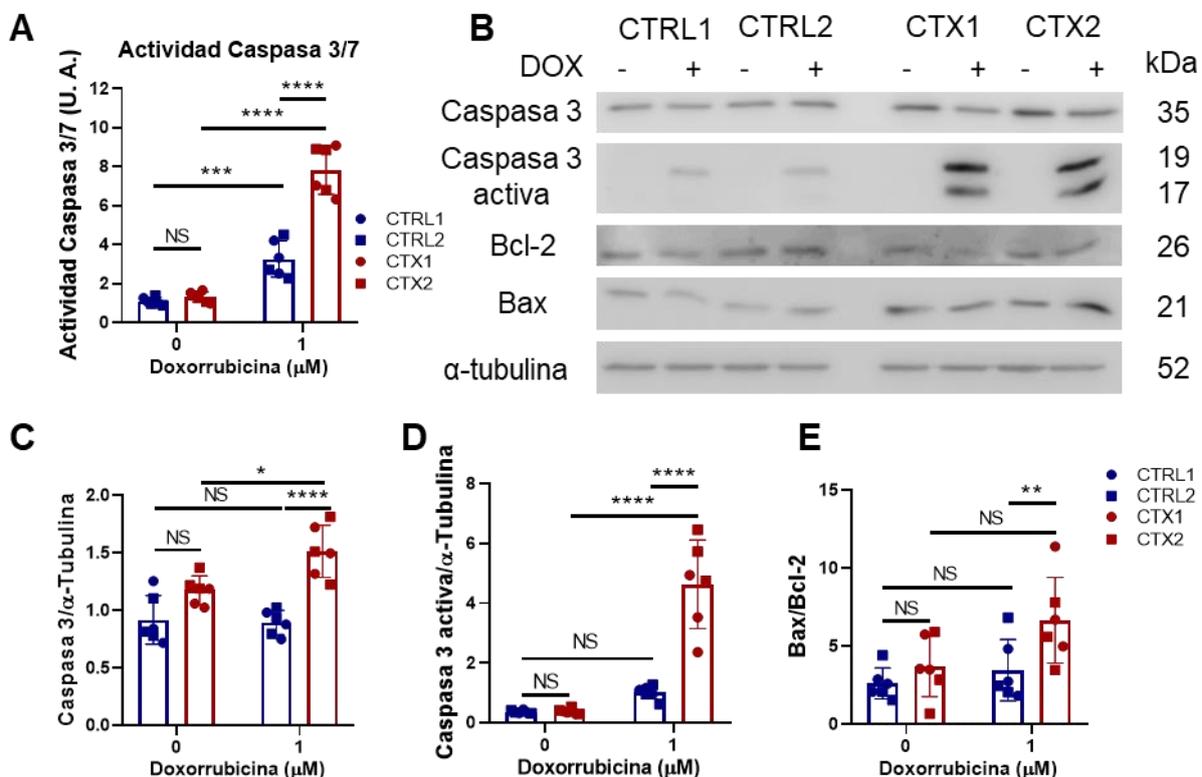


Figura 14. Actividad y expresión de proteínas pro-apoptóticas en hiPSC-CM CTRL y CTX tratadas con doxorrubicina. **A)** Actividad caspasa 3/7 registrada en extractos celulares de hiPSC-CM CTRL y CTX tratadas con doxorrubicina y sin tratamiento. La actividad caspasa 3/7 se determinó por luminometría utilizando el kit Caspase-Glo 3/7® de Promega. **B)** Western Blots representativos de caspasa 3, caspasa 3 activa, bcl-2, bax y α -tubulina de hiPSC-CM CTRL y CTX tratados con doxorrubicina y sin

tratamiento. **C)** Expresión relativa de la caspasa 3 cuantificada por densitometría. **D)** Expresión relativa de la caspasa 3 activa cuantificada por densitometría. **E)** Ratio entre la proteína pro-apoptótica Bax y la proteína anti-apoptótica bcl-2. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, NS = no significativo.

3.2 Los hiPSC-CM CTX tienen unos niveles superiores de estrés oxidativo comparados con los hiPSC-CM CTRL tras el tratamiento con doxorrubicina

El estrés oxidativo es uno de los principales componentes de la cardiotoxicidad inducida por doxorrubicina. Por ese motivo, se analizaron los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los hiPSC-CM CTRL y CTX tras el tratamiento con doxorrubicina. Para la detección de todos los ROS de la célula se realizó una tinción con DCFH-DA y las células se analizaron por citometría de flujo. Se observaron mayores niveles de ROS en los hiPSC-CM CTX tratados con doxorrubicina que en los CTRL (Figura 15A). Además, se realizó una tinción con MitoSOX® para determinar los niveles de superóxido (O_2^-) mitocondrial, y se comprobó que el número de células positivas para MitoSOX® era mayor en los hiPSC-CM CTX tratados con doxorrubicina que en los CTRL (Figura 15B). También se analizaron los niveles de glutatión reducido (GSH), ya que el GSH se utiliza en la detoxificación de ROS, oxidándose a GSSG, por lo que la depleción de GSH indica unos niveles más elevados de ROS en las células. Se observó que los niveles de GSH estaban significativamente reducidos en los hiPSC-CM CTX tratados con doxorrubicina comparados con los hiPSC-CM CTRL (Figura 15C). Para comprender mejor las diferencias observadas entre los cardiomiocitos CTRL y CTX se estudió la expresión de varios genes relacionados con los ROS (Figura 15D). Se observó una mayor expresión de *CAT*, que codifica la enzima catalasa, responsable de la detoxificación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y *NRF1*, un factor de transcripción involucrado en la expresión de varios genes antioxidantes, en los cardiomiocitos CTRL sin tratamiento con doxorrubicina comparados con los cardiomiocitos CTX, también sin tratar. Al ser tratados con doxorrubicina, *CAT* siguió teniendo una mayor expresión en los hiPSC-CM CTRL y también se observó una mayor expresión de *SOD1*, que codifica la superóxido dismutasa 1, una enzima que detoxifica superóxido en las células. Sorprendentemente, se observó una mayor expresión de *NQO2*, una tiorredoxina (TRX) involucrada en la detoxificación de ROS, en los hiPSC-CM CTRL sin tratamiento con doxorrubicina comparados con los CTX, pero no hubo

diferencias entre los hiPSC-CM CTRL y CTX después del tratamiento con doxorrubicina. No se encontraron diferencias en la expresión de *TXN* ni *NRF2* entre los grupos experimentales. Por último, se estudiaron los niveles de catalasa y superóxido dismutasa 1 por Western Blot (Figura 15E-G). Sorprendentemente, no se observaron diferencias en los niveles de proteína de la catalasa entre los grupos experimentales, a pesar de haber visto diferencias a nivel de su ARNm. Por otra parte, a nivel de proteína la superóxido dismutasa 1 sí que se comporta de la misma manera que el ARNm, observándose unos niveles de SOD1 más elevados en los hiPSC-CM CTRL tratados con doxorrubicina comparados con los hiPSC-CM CTX, también tratados con doxorrubicina.

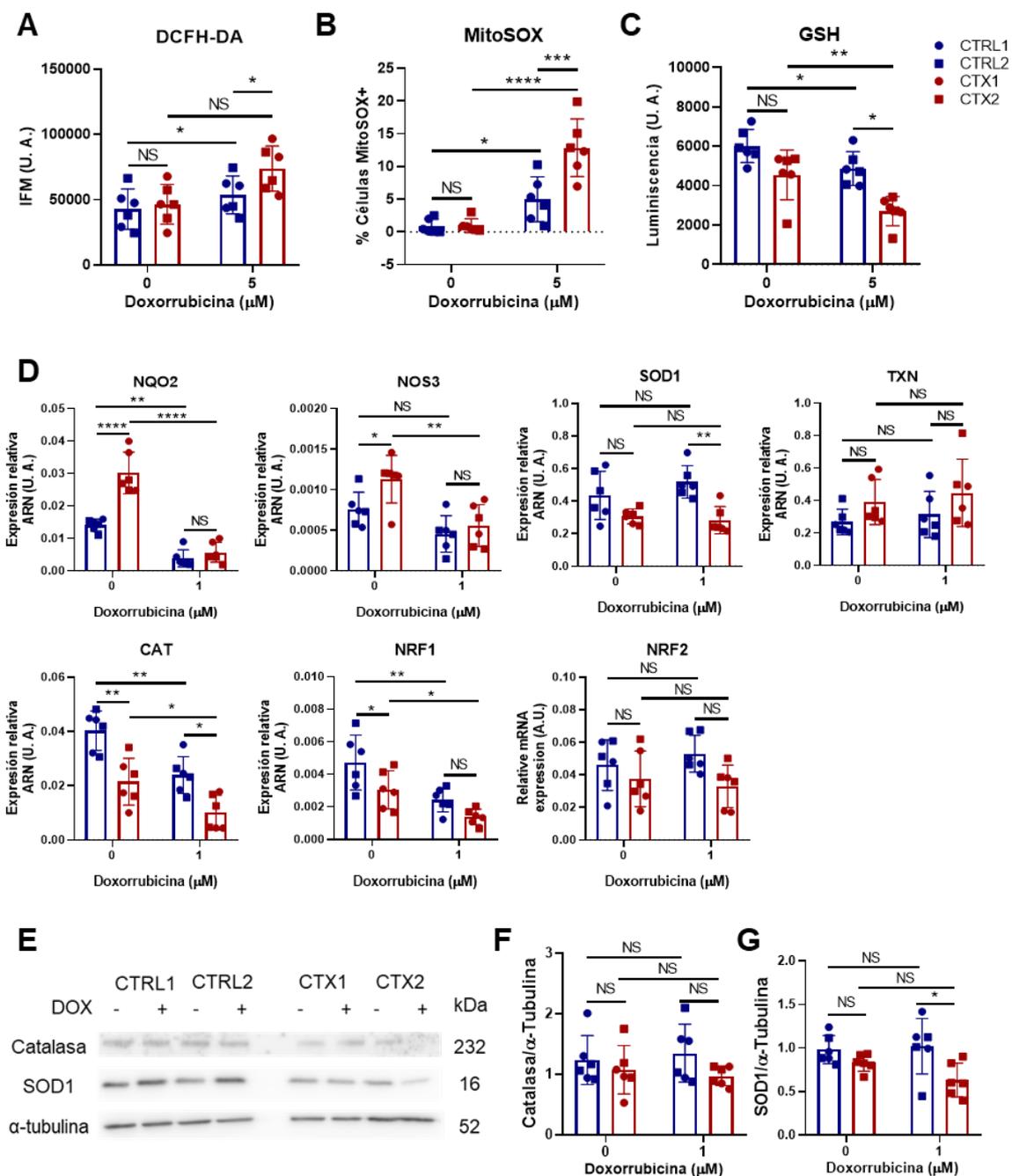


Figura 15. Efecto de la doxorubicina sobre el estrés oxidativo en hiPSC-CM CTX y CTRL. **A)** Cuantificación de ROS totales en hiPSC-CM CTRL y CTX tras el tratamiento con doxorubicina. Las células se tiñeron con DCFH-DA y se analizaron por citometría de flujo. **B)** Cuantificación del superóxido mitocondrial en hiPSC-CM CTRL y CTX tras el tratamiento con doxorubicina. Las células se tiñeron con MitoSOX® y se analizaron por citometría de flujo. **C)** Niveles de GSH en hiPSC-CM CTRL y CTX tratados con doxorubicina. Los niveles de GSH se determinaron con el kit GSH-Glo™ de Promega. **D)** Expresión de diferentes genes relacionados con la detoxificación de ROS en hiPSC-CM CTRL y CTX tratados con doxorubicina y sin tratamiento. Para normalizar los datos de RT-qPCR, se ha utilizado como control endógeno el *GAPDH*. **E)** Western Blots representativos de catalasa, superóxido dismutasa 1 y α -tubulina de hiPSC-CM CTRL y CTX tratados con doxorubicina y sin tratamiento. **F)** Expresión relativa de la catalasa cuantificada por densitometría. **G)** Expresión relativa de la SOD1 cuantificada por densitometría. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, NS = no significativo.

3.3 Los hiPSC-CM CTX tienen unos mayores niveles de daño genotóxico y mitocondrial que los hiPSC-CM CTRL tras el tratamiento con doxorubicina

Uno de los principales mecanismos por los cuales la doxorubicina causa daño en los cardiomiocitos es mediante la unión a la topoisomerasa II β , causando roturas de doble cadena en el ADN. Esto produce errores en la transcripción génica, daño mitocondrial y la formación de ROS. Para estudiar las diferencias en el daño genotóxico inducido por doxorubicina se realizó una inmunofluorescencia contra la fosfo-histona γ -H2AX, que marca roturas de doble cadena en el ADN. Se observó, de manera cualitativa, más núcleos marcados para p-histona γ -H2AX en los hiPSC-CM CTX tratados con doxorubicina comparados con los CTRL (Figura 16A). Para cuantificar los niveles de p-histona γ -H2AX se realizó un Western Blot y se observó que los niveles de p-histona γ -H2AX eran significativamente mayores en los cardiomiocitos CTX tratados con doxorubicina que en los CTRL (Figura 16A).

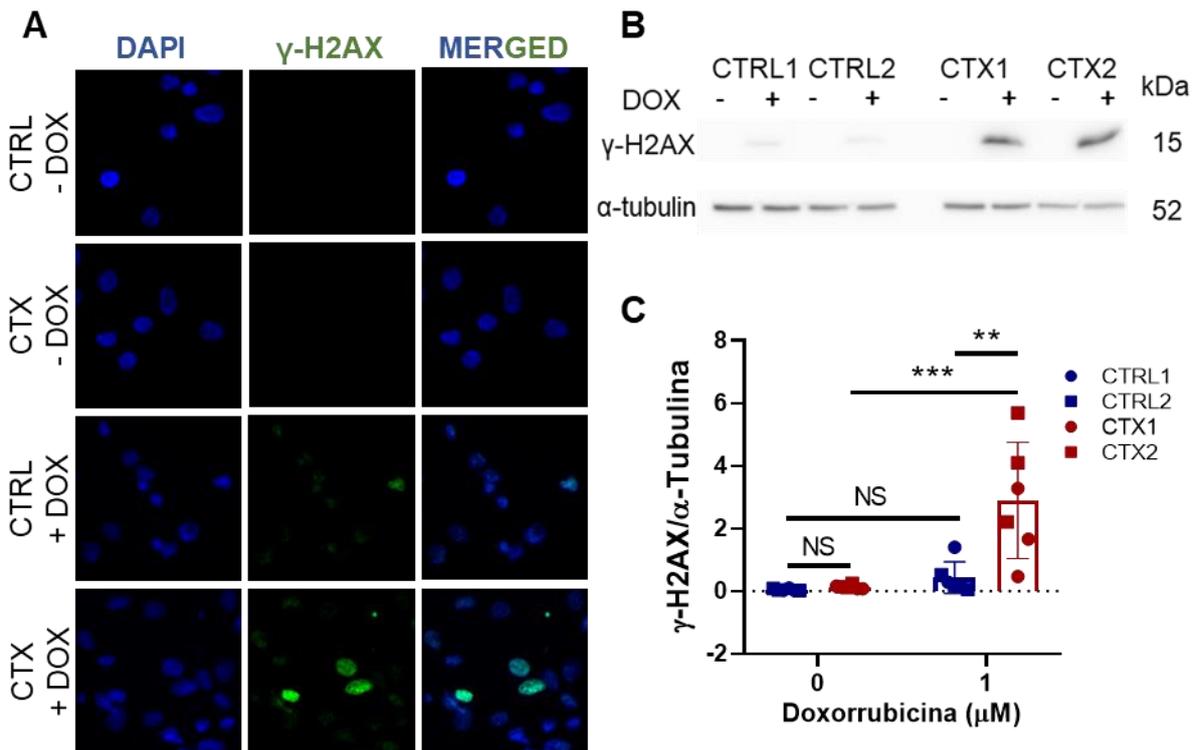


Figura 16. Efecto de la doxorubicina sobre el daño genotóxico en hiPSC-CM CTRL y CTX tratadas con doxorubicina. **A)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra la histona γ -H2AX. En los hiPSC-CM CTX tratadas con doxorubicina se pueden observar más núcleos marcados para la histona γ -H2AX (en verde) y más intensamente en comparación con los hiPSC-CM CTRL. No se observa marcaje en los hiPSC-CM CTRL ni CTX sin tratamiento con doxorubicina. **B)** Western blots representativos de la histona γ -H2AX en hiPSC-CM CTRL y CTX tratados y sin tratar con doxorubicina. **C)** Expresión relativa de la histona γ -H2AX cuantificada por densitometría. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. $**p < 0.01$, $***p < 0,001$, NS = no significativo.

Otro de los mecanismos de cardiotoxicidad de la doxorubicina es producir daño en las mitocondrias. Para determinar el daño mitocondrial en los hiPSC-CM CTRL y CTX se realizó una tinción con JC-1. El JC-1 es un colorante que actúa como un sensor del potencial de membrana mitocondrial. El JC-1 se acumula en las mitocondrias y forma agregados que emiten fluorescencia de color rojo (590 nm). Cuando las mitocondrias están dañadas y las células entran en apoptosis, se producen poros en la membrana mitocondrial, por lo que las mitocondrias se despolarizan. Cuando las mitocondrias están despolarizadas, el JC-1 no se acumula en su interior y permanece en su forma monomérica, marcando el citoplasma de las células de color verde (529 nm). Por tanto, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial viene determinada por una disminución de la ratio entre la intensidad de fluorescencia roja y la verde. Se observó que los hiPSC-CM CTRL tratados con doxorubicina tenían una ratio de intensidad de

fluorescencia roja/verde significativamente mayor que los hiPSC-CM CTX, indicando una menor despolarización de las mitocondrias en los hiPSC-CM CTRL (Figura 17A, B).

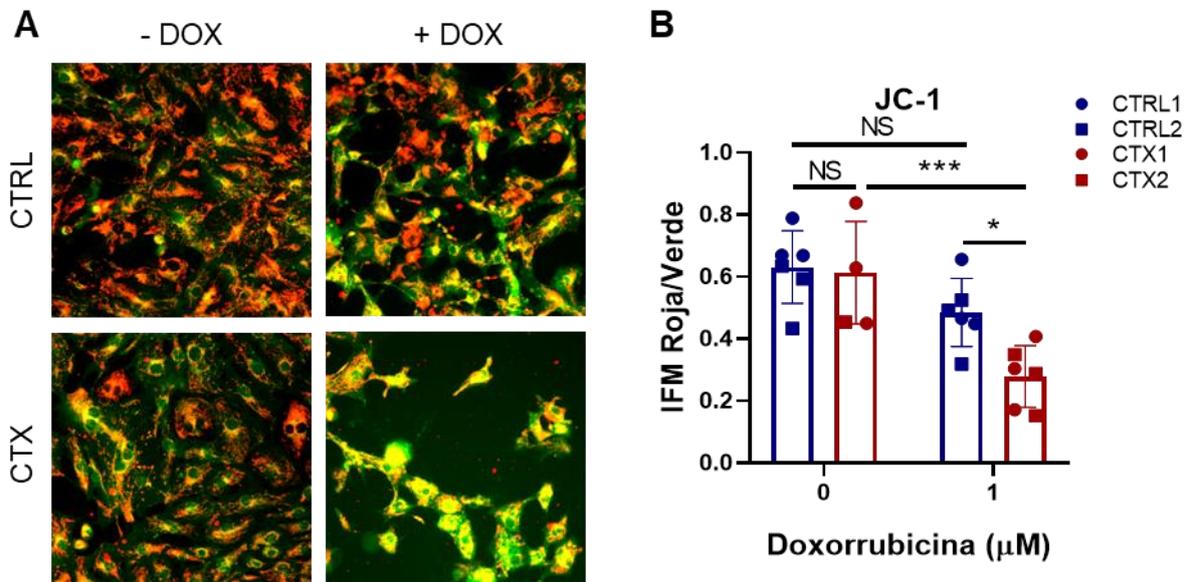


Figura 17. Efecto de la doxorrubicina sobre el potencial de membrana mitocondrial en hiPSC-CM CTRL y CTX tras el tratamiento con doxorrubicina. **A)** Imágenes representativas de la tinción con JC-1 en hiPSC-CM CTRL y CTX tratados con doxorrubicina y sin tratamiento. Se muestra el merged entre los canales rojo y verde. **B)** Ratio entre la intensidad de fluorescencia roja y verde determinado con ImageJ. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, NS = no significativo.

3.4 Daño sarcomérico causado por la doxorrubicina en hiPSC-CM CTRL y CTX

La doxorrubicina causa la desorganización de los sarcómeros de los cardiomiocitos afectando a su capacidad contráctil. Para estudiar la desorganización de los sarcómeros en los hiPSC-CM CTRL y CTX tratados con doxorrubicina se realizó una tinción contra la α -actinina sarcomérica y la troponina cardíaca T. Se observó que los hiPSC-CM CTX tenían una mayor desorganización sarcomérica que los CTRL al ser tratados con doxorrubicina, ya que en ambas tinciones se pueden ver más zonas en las que las proteínas sarcoméricas se muestran como un punteado en lugar de las bandas características de los sarcómeros (Figura 18A). Estas diferencias se cuantificaron empleando la tinción frente a la α -actinina sarcomérica (Figura 18B). Se observó que el grado de desorganización de los sarcómeros aumenta significativamente tras el

tratamiento con doxorubicina tanto en los hiPSC-CM CTRL como en los CTX. No obstante, el porcentaje de desorganización sarcomérica de los hiPSC-CM CTX tratados con doxorubicina es significativamente mayor (~35%) que el de los hiPSC-CM CTRL tratados con doxorubicina (~19%).

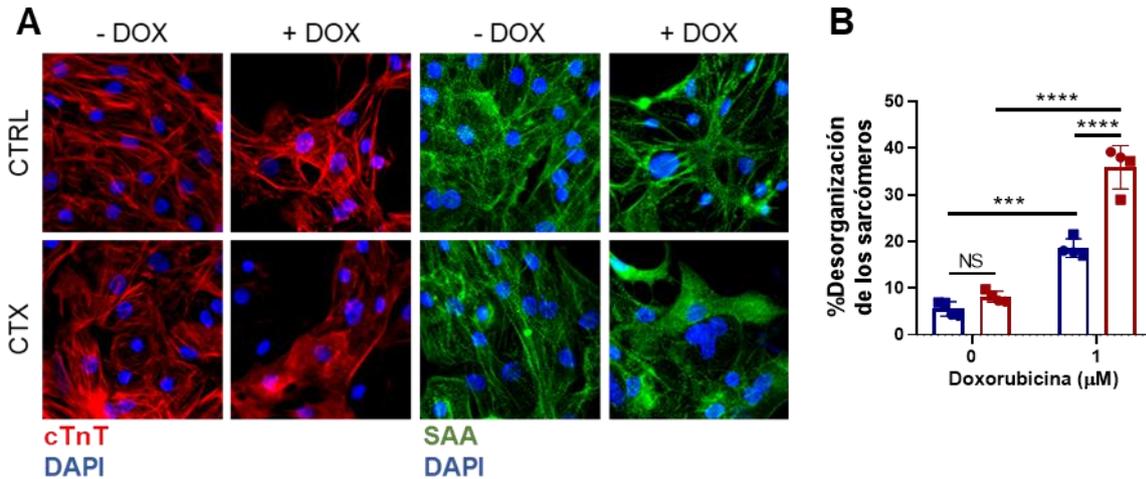
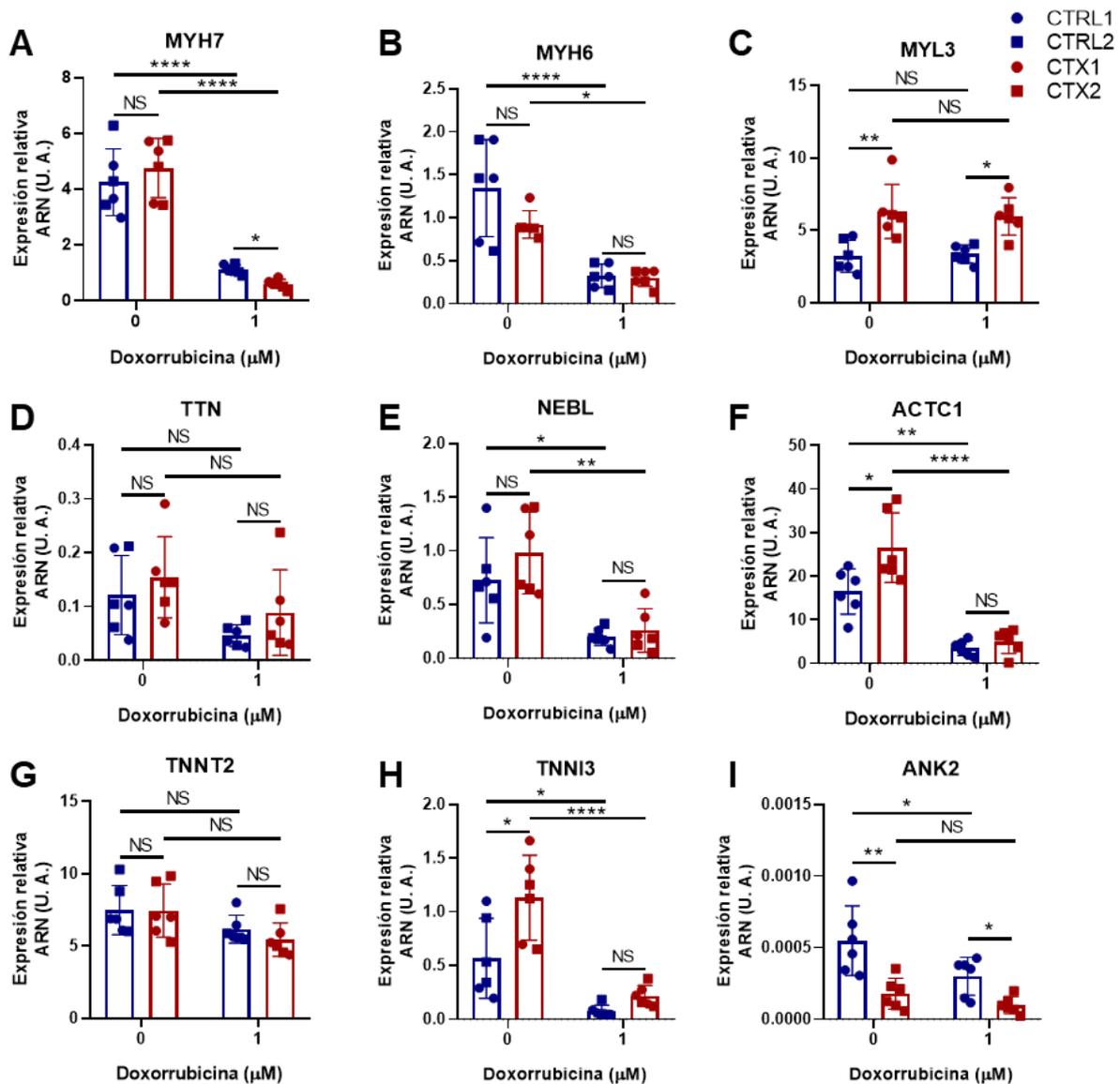


Figura 18. Efecto de la doxorubicina sobre la organización de los sarcómeros en hiPSC-CM CTRL y CTX tratados con doxorubicina. **A)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra las proteínas sarcoméricas cTnT (rojo) y SAA (verde) de hiPSC-CM CTRL y CTX tratados y sin tratar con doxorubicina. **B)** Porcentaje de desorganización sarcomérica en hiPSC-CM CTRL y CTX tratados y sin tratar con doxorubicina calculado a partir de las tinciones realizadas para la α -actinina sarcomérica. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. *** p < 0,001, **** p < 0,0001, NS = no significativo.

Por otra parte, también se estudiaron las diferencias en la expresión de diferentes genes que codifican proteínas sarcoméricas. En el caso de los genes *MYH7* y *MYH6*, los cuáles codifican para las cadenas pesadas de la miosina 7 y 6, respectivamente, se puede observar que la doxorubicina produce una disminución de su expresión tanto en los hiPSC-CM CTRL como los CTX (Figura 19A, B). Además, en los hiPSC-CM CTX la disminución de la expresión de *MYH7* causada por la doxorubicina es significativamente mayor que en los hiPSC-CM CTRL. Por otra parte, el gen *MYL3* codifica para la cadena ligera de la miosina 3 y su expresión no se ve afectada por el tratamiento con doxorubicina (Figura 19C). No obstante, se observa una mayor expresión de este gen en los cardiomiocitos CTX comparados con los CTRL. No se han observado diferencias en la expresión del gen *TTN*, el cuál codifica la proteína titina, entre los diferentes grupos experimentales, mientras que en el caso del gen *NEBL*,

que codifica para la proteína nebulina, se puede ver que la doxorubicina produce una disminución de su expresión en cardiomiocitos CTRL y CTX (Figura 19D, E). Por lo que respecta al gen *ACTC1*, que codifica la α -actinina cardíaca, se puede observar una mayor expresión en los hiPSC-CM CTX respecto a los CTRL a nivel basal, mientras que con el tratamiento con doxorubicina se produce una disminución significativa de los niveles de *ACTC1* tanto en hiPSC-CM CTRL como CTX respecto a los cardiomiocitos sin tratar, pero no hay diferencias entre hiPSC-CM CTRL y CTX ambos tratados con doxorubicina (Figura 19 F). Por lo que respecta a los genes que codifican para las troponinas, no se han observado diferencias en la expresión de *TNNT2*, que codifica la troponina cardíaca T, entre los diferentes grupos experimentales, mientras que en el caso del gen *TNNI3*, que codifica la troponina cardíaca I, se ha observado que la doxorubicina produce una disminución de su expresión en los hiPSC-CM CTRL y los CTX y, además, a nivel basal la expresión de *TNNI3* es significativamente mayor en los hiPSC-CM CTX (Figura 19 G, H). Por último, se estudió la expresión de la *ANK2*, que codifica la anquirina 2, una proteína de anclaje entre el sarcómero y el sarcolema (Figura I). Se pudo observar que tanto en presencia como ausencia de tratamiento con doxorubicina la expresión de *ANK2* es significativamente superior en los hiPSC-CM CTRL respecto a los CTX. Además, la doxorubicina produce una bajada significativa de la expresión de *ANK2* en los hiPSC-CM CTRL.



3.5 Diferencias en la expresión génica entre hiPSC-CM CTRL y CTX tratadas con doxorrubicina

A continuación, se estudió si había diferencias en la expresión de diferentes canales de potasio, sodio y calcio entre las líneas de hiPSC-CTRL y CTX con y sin doxorrubicina (Figura 20A-G). Para la mayoría de los canales estudiados no se observaron diferencias estadísticamente significativas. No obstante, en el caso del gen *SCN5A*, el cual codifica la subunidad 5 del canal de sodio regulado por voltaje α , se puede ver

una mayor expresión en los cardiomiocitos hiPSC-CM CTX comparados con los CTRL tanto en presencia como ausencia de doxorubicina (Figura 20G). Además, la doxorubicina tan solo produce una disminución significativa de la expresión del *SCN5A* en los cardiomiocitos CTRL.

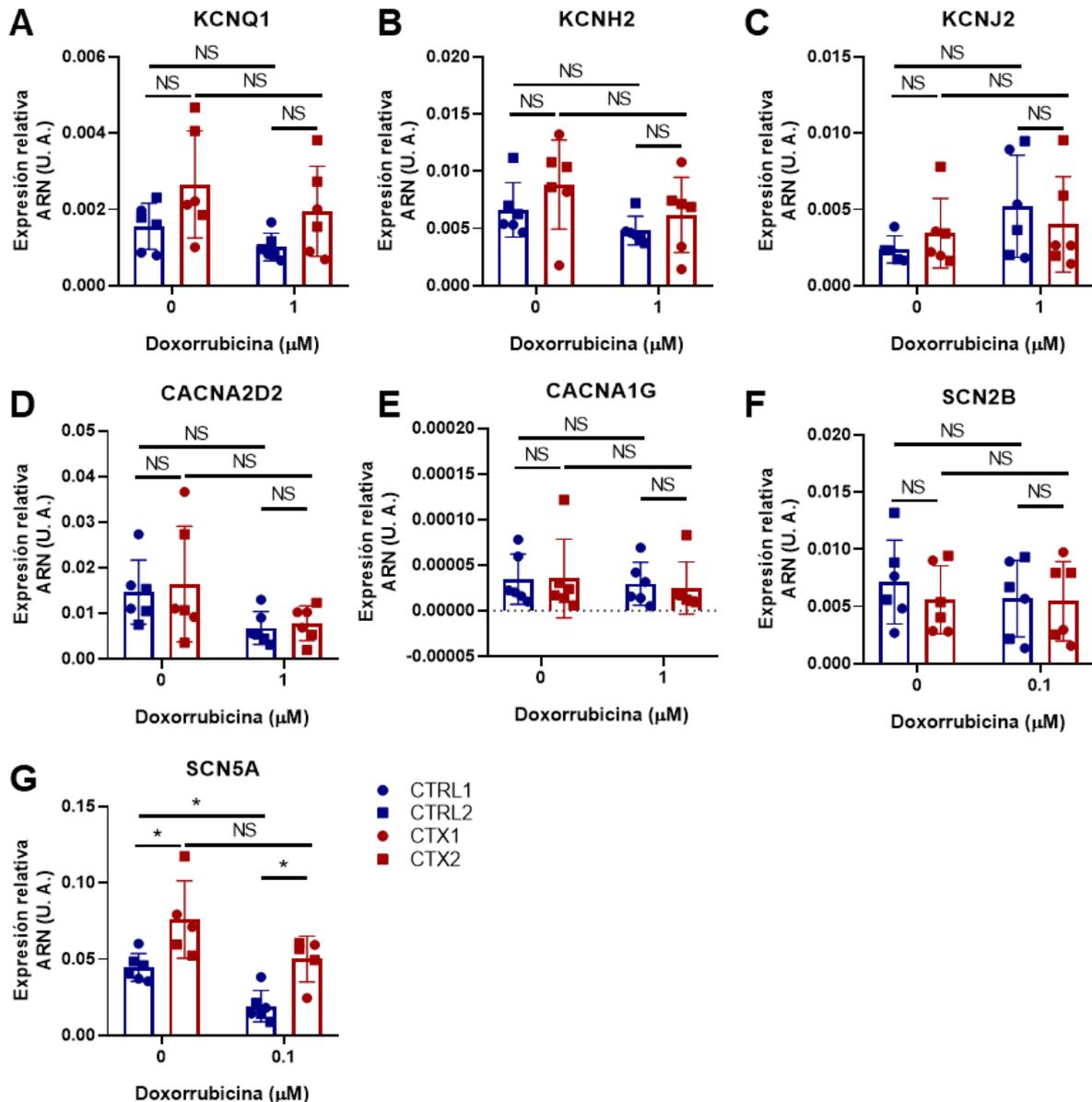


Figura 20. Efecto de la doxorubicina en la expresión de genes que codifican canales iónicos. **A) – G)** Expresión relativa de *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNJ2*, *CACNA2D2*, *CACNA1G*, *SCN2B* y *SCN5A*. Para normalizar los datos de RT-qPCR, se ha utilizado como control endógeno el *GAPDH*. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * $p < 0,05$, NS = no significativo.

Los cardiomiocitos son capaces de activar programas inflamatorios y fibrogénicos en respuesta al daño²³⁶. Por este motivo, se decidió estudiar la expresión de diferentes genes relacionados con la fibrosis y la vía de señalización de TGF- β en presencia y ausencia de doxorubicina. En cuanto a los genes de la vía de señalización de TGF- β , se pudo comprobar que en todos los genes estudiados (*TGFBR1*, *SMAD2* y *SMAD4*) la doxorubicina no altera su expresión ni en los cardiomiocitos CTRL ni en los CTX (Figura 21A-C). No obstante, tanto en presencia como ausencia de doxorubicina se pudo observar que estos genes están sobreexpresados de forma significativa en los hiPSC-CM CTX comparados con los CTRL. También se estudió la expresión de los genes de la periostina y la fibrilina 1 (*POSTN* y *FBN1* respectivamente), ya que se ha visto que estas proteínas están aumentadas en la fibrosis cardíaca (Figura 21D, E). Se pudo comprobar que el tratamiento con doxorubicina no afecta a la expresión de *POSTN* tanto en los hiPSC-CM CTRL como los CTX, pero los niveles de mensajero de esta proteína pro-fibrótica sí que se encuentran aumentados significativamente en hiPSC-CM CTX tratados con doxorubicina comparados con hiPSC-CM CTRL, también tratados con doxorubicina. En el caso de la fibrilina 1, el tratamiento con doxorubicina no aumenta la expresión de su mensajero en los hiPSC-CM CTRL, pero sí que lo hace en los CTX. Además, los niveles de *FBN1* en los cardiomiocitos CTX tratados con doxorubicina son significativamente superiores a los niveles de *FBN1* de los cardiomiocitos CTRL.

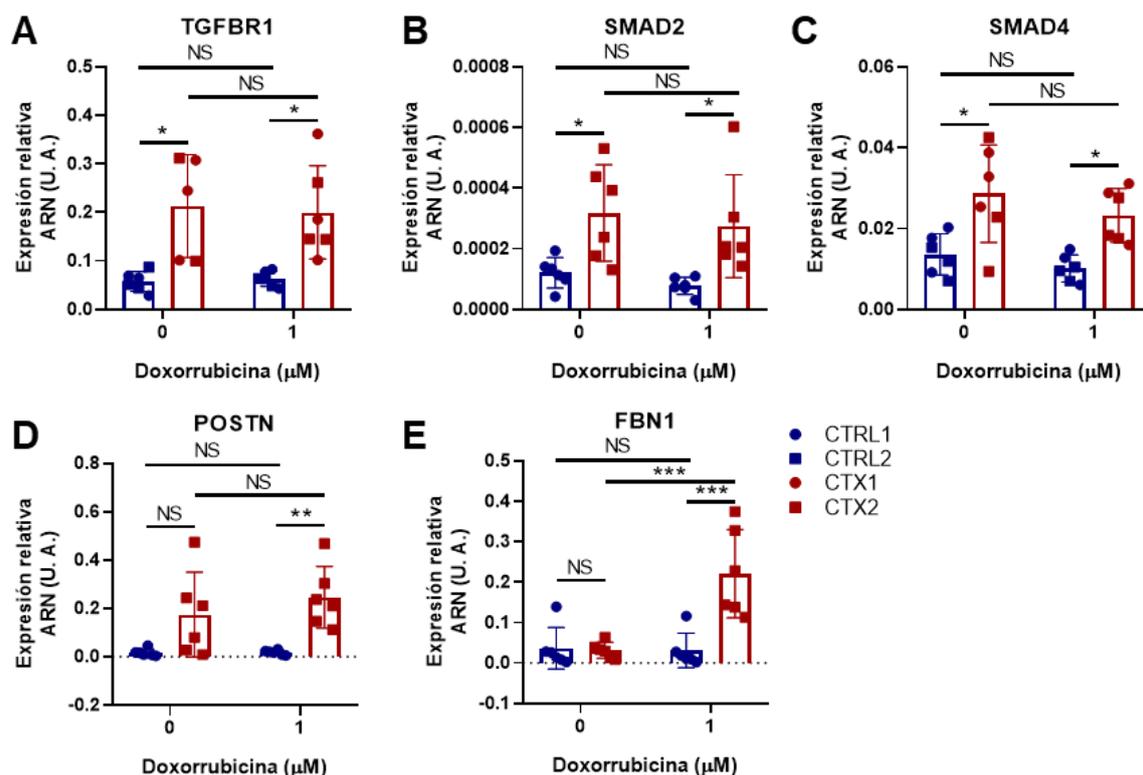


Figura 21. Efecto de la doxorrubicina en la expresión de genes pro-fibróticos. **A) – E)** Expresión relativa de *TGFBR1*, *SMAD2*, *SMAD4*, *POSTN* y *FBN1*. Para normalizar los datos de RT-qPCR, se ha utilizado como control endógeno el *GAPDH*. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$, NS = no significativo.

Por último, se estudió la expresión de *GDF15* y *CKM* (Figura 22A, B). *GDF15* codifica el factor de crecimiento y diferenciación 15 y *CKM* la creatina quinasa y ambas proteínas aumentan sus niveles en sangre después del daño cardíaco. Se ha comprobado que la doxorrubicina produce un aumento significativo de la expresión de *GDF15* en los hiPSC-CM CTX, mientras que en los hiPSC-CM CTRL tan solo se observa una tendencia. Además, la expresión de *GDF15* en los hiPSC-CM CTX tratados con doxorrubicina es significativamente mayor que en los hiPSC-CM CTRL. Por otra parte, se ha observado que la expresión de *CKM* es mayor en hiPSC-CM CTX comparados con los CTRL tanto en presencia como ausencia de doxorrubicina. Además, los niveles de *CKM* bajan de forma significativa tras el tratamiento con doxorrubicina en el caso de los hiPSC-CM CTX.

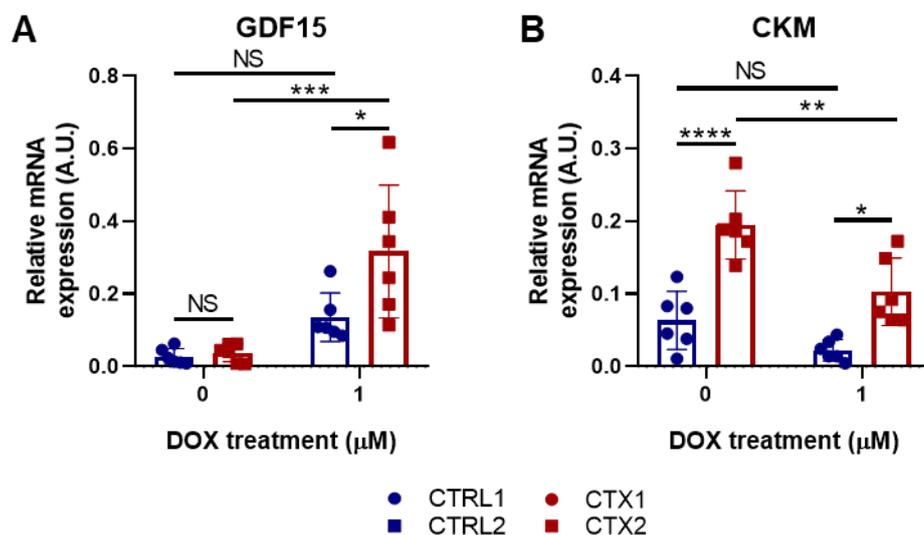


Figura 22. Efecto de la doxorrubicina en la expresión de genes marcadores de daño cardíaco. **A), B)** Expresión relativa de *GDF15* y *CKM*. Para normalizar los datos de RT-qPCR, se ha utilizado como control endógeno el *GAPDH*. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, NS = no significativo.

3.6 Diferencias en la expresión de miARNs entre hiPSC-CM CTRL y CTX tratadas con doxorubicina

Como ya se ha comentado en la introducción, los miARNs pueden ejercer efectos cardioprotectores. Por este motivo, se quiso estudiar la expresión de varios miARNs que han mostrado efectos cardioprotectores en diferentes enfermedades cardíacas en los cardiomiocitos de los pacientes oncológicos pediátricos, así como en los cardiomiocitos control, con y sin tratamiento con doxorubicina (Figura 23A-I). En la mayoría de los miARNs estudiados se ha podido observar que la doxorubicina produce un incremento de su expresión tan solo en los cardiomiocitos CTRL, con la excepción del miR-150-5p, el cual también aumenta su expresión tras el tratamiento con doxorubicina en los hiPSC-CM CTX. Además, la expresión de estos miARNs es significativamente superior en los hiPSC-CM CTRL tratados con doxorubicina comparados con los hiPSC-CM CTX. Tan solo se ha observado una expresión significativamente más alta en hiPSC-CM CTRL respecto a los CTX en condiciones basales de un miARN, el miR-4732-3p, sin embargo, no se ha observado que este miARN aumente tras el tratamiento con doxorubicina ni en los cardiomiocitos CTRL ni CTX y tampoco hay diferencias entre los cardiomiocitos CTRL y CTX después del tratamiento con doxorubicina.

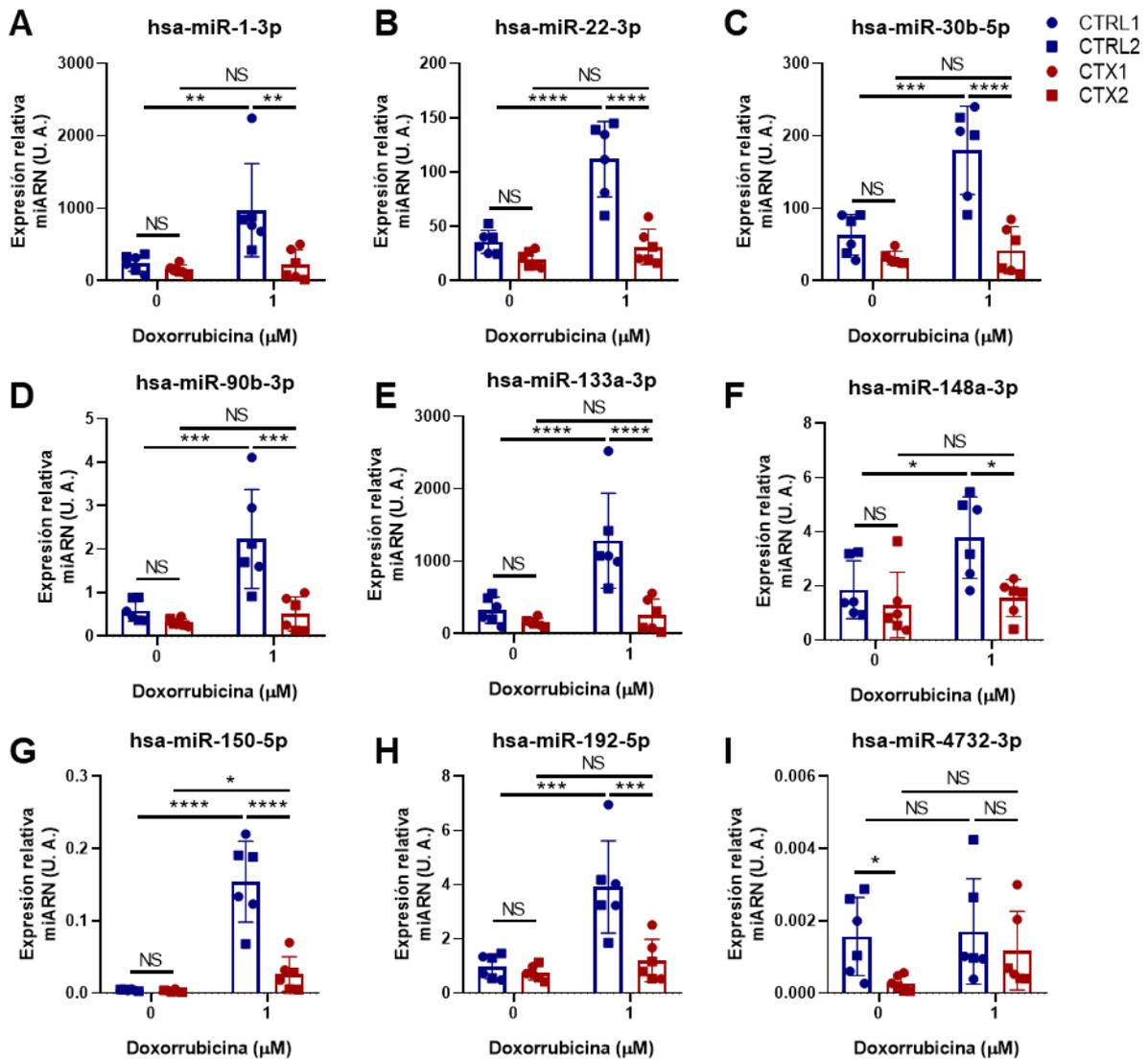


Figura 23. Efecto de la doxorrubicina en la expresión de miARN cardioprotectores en hiPSC-CM CTRL y CTX. A) - I) Expresión relativa de hsa-miR-1-3p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-90b-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-192-5p y hsa-miR-4732-3p. Para normalizar los datos de RT-qPCR, se ha utilizado como control endógeno el ARN nuclear pequeño U6. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, NS = no significativo.

4. Estudio de miARNs diferencialmente expresados entre pacientes con cáncer de mama positivas y negativas para la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas

Como se ha comentado en la introducción, los miARNs son moléculas involucradas en diversos procesos patológicos, incluyendo la patología cardiovascular y el cáncer. En consecuencia, los miARNs están siendo investigados como posibles biomarcadores para la cardiotoxicidad y también como agentes terapéuticos. En un trabajo previo de nuestro grupo se estudió la expresión de miARNs en muestras de suero de pacientes con cáncer de mama que sufrieron cardiotoxicidad como consecuencia de su tratamiento con antraciclinas. Se obtuvieron muestras de suero después de la quimioterapia de 10 pacientes positivas para cardiotoxicidad y 10 negativas, se aisló el miARN y se analizó mediante una miARNseq en una plataforma Illumina. Del análisis de 2546 miARNs en miRBase, se detectaron 212 miARNs y fueron normalizados por su abundancia relativa. Estos datos se encuentran disponibles en la base de datos BioStudies (<http://www.ebi.ac.uk/biostudies>) bajo el código de acceso S-HECA437.

Se emplearon tres modelos de regresión diferentes (Elastic Net, Negative Binomial y Random Forest) para analizar las diferencias en la expresión de miARN en suero entre las pacientes positivas y las negativas para la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina. De este modo, se identificó un panel de 25 miARNs diferencialmente expresados entre los casos y los controles. De los 25 miARNs diferencialmente expresados, 19 fueron identificados por el modelo Random Forest. El Elastic Net identificó 9 miARNs, dos de los cuales también estaban incluidos en el panel seleccionado por el Random Forest (miR-30b-5p y miR-30c-5p) y otro más que también fue detectado por el modelo Negative Binomial (miR-4732-3p). Los resultados combinados de los tres modelos de regresión se muestran en el diagrama de Venn de la Figura 24A. La prueba Negative Binomial solo encontró diferencias en la expresión del miR-4732-3p, siendo este el único identificado por los tres modelos de regresión. Dado que el miR-4732-3p fue el único miARN diferencialmente expresado en los tres modelos de regresión se estudió su posible papel cardioprotector frente al daño por doxorubicina. Las diferencias en la expresión del miR-4732-3p se confirmó por RT-qPCR en dos cohortes de pacientes con cáncer de mama que experimentaron cardiotoxicidad inducida por antraciclinas (Figura 24B).

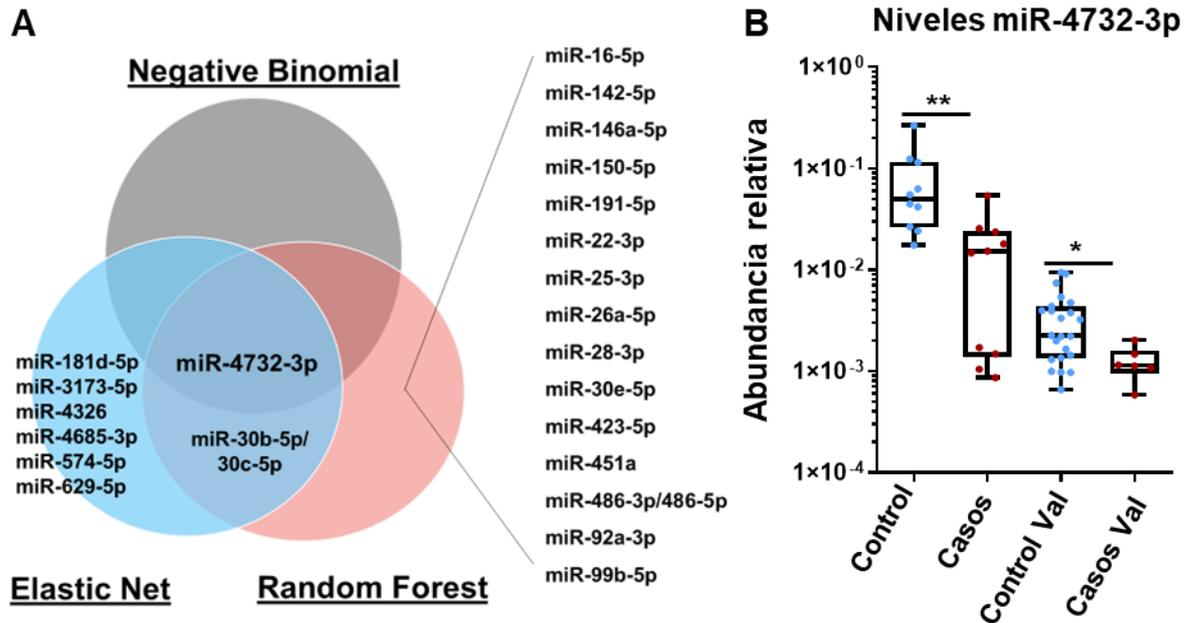


Figura 24. Perfil de expresión de miARNs en pacientes de cáncer de mama con cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. **A)** Diagrama de Venn mostrando los miARNs comunes diferencialmente expresados en casos vs controles de la cohorte principal. **C)** Niveles de miR-4732-3p determinados por RT-qPCR en casos y controles de la cohorte principal y una cohorte de validación. Los datos han sido representados como la mediana, mínimo, máximo, mostrados gráficamente como diagramas de cajas (puntos rojos para los casos y azules para los controles). * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$.

5. Estudio del papel cardioprotector del miR-4732-3p *in vitro*

5.1 Efecto del miR-4732-3p frente al daño por doxorrubicina en cardiomiocitos neonatales de rata

Quisimos estudiar si el miR-4732-3p tenía un efecto cardioprotector frente al daño inducido por la doxorrubicina, ya que fue el miARN más diferencialmente expresado entre pacientes de cáncer de mama positivas y negativas para cardiotoxicidad. Además, en un trabajo anterior del grupo ya se demostró el efecto cardioprotector de este miARN frente al daño por privación de oxígeno y glucosa. En lugar de estudiar directamente si el miR-4732-3p protege frente al daño por doxorrubicina en hiPSC-CM, se decidió utilizar un modelo celular más sencillo. Para ello, se aislaron cardiomiocitos neonatales de rata (NRCM) los cuales fueron transfectados con el mimic-4732 para producir una sobreexpresión del miR-4732-3p y, posteriormente, fueron tratados con

doxorubicina. Como control de la transfección se empleó un Mimic control negativo (Mimic-NC). En la Figura 25A se puede ver un esquema del proceso. En primer lugar, se realizó una curva de viabilidad tratando NRCM sin transfectar con doxorubicina, para seleccionar una dosis de doxorubicina que causara aproximadamente un descenso de la viabilidad del 40% (Figura 25B). Se seleccionó la dosis de doxorubicina de 1 μM durante con un tiempo de exposición de 48 h. Por otra parte, para comprobar si la transfección con Mimic-4732 tenía algún efecto sobre la viabilidad de los NRCM en ausencia de doxorubicina, se transfectaron con dos dosis diferentes de Mimic-4732 (20 y 40 nM) y se evaluó la viabilidad mediante CCK8 a las 24 h (Figura 25C). Se comprobó que la transfección con el Mimic-4732 no tenía ningún efecto sobre la viabilidad de los NRCM a las dosis testadas y se seleccionó la dosis de 40 nM para futuros experimentos.

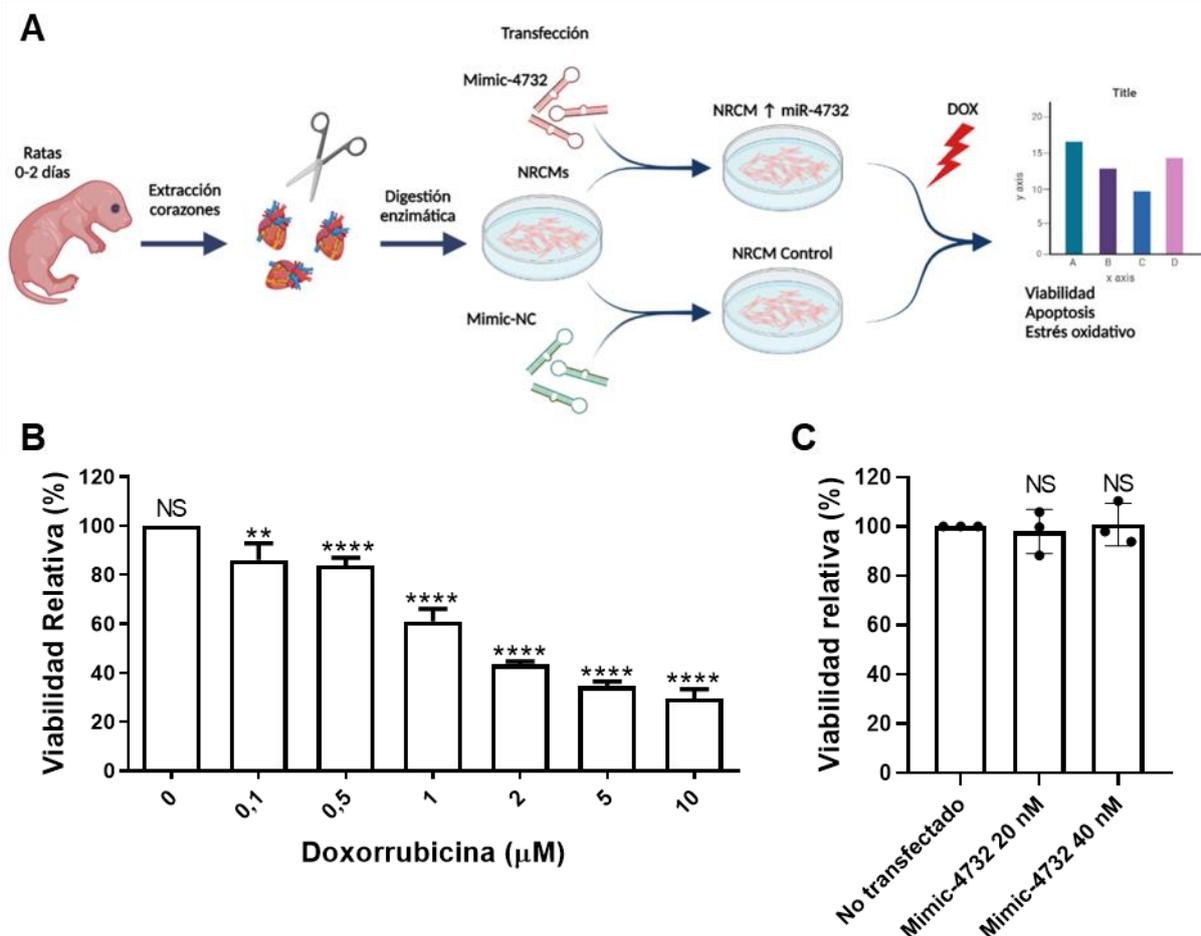


Figura 25. Modelo de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina *in vitro*. **A)** Esquema del proceso de aislar NRCM, transfectarlos con el Mimic-4732 o el Mimic-NC, tratarlos con doxorubicina, y realizar las pruebas de viabilidad, apoptosis y estrés oxidativo. **B)** Efecto de la doxorubicina sobre la viabilidad de

los NRCM a diferentes dosis con un tiempo de exposición de 48 h. **C)** Efecto de la transfección con el Mimic-4732 sobre la viabilidad de los NRCM a diferentes dosis con un tiempo de exposición de 24 h. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. $**p < 0.01$, $****p < 0,0001$, NS = no significativo.

Antes de llevar a cabo los experimentos para estudiar el efecto cardioprotector del miR-4732-3p se determinó si el tratamiento con antraciclinas podía modular lo niveles de este miARN en cultivos de células cardíacas tratando NRCM y RCF con doxorubicina durante 48 h. Se observó que la expresión del miR-4732-3p se elevaba tras el tratamiento con doxorubicina (Figura 26A, B).

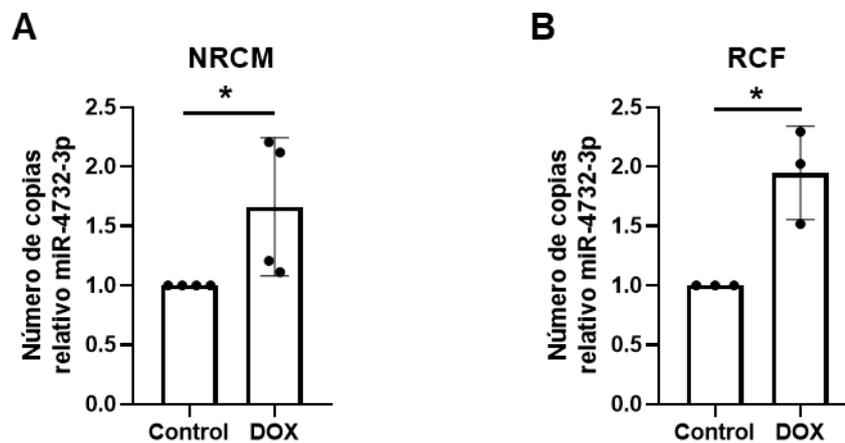


Figura 26. Número relativo de copias de miR-4732-3p en células cardíacas tras el tratamiento con doxorubicina. **A)** Expresión del miR-4732-3p tras el tratamiento con doxorubicina en NRCM. **B)** Expresión del miR-4732-3p en RCF tras el tratamiento con doxorubicina. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. $*p < 0,05$.

Los resultados de sobreexpresión del miR-4732-3p en los cardiomiocitos mostraron que este miARN proporciona un grado de cardioprotección significativo tras el tratamiento con doxorubicina. Se observó que la transfección con el Mimic-4732 aumenta significativamente la viabilidad de los cardiomiocitos tras el tratamiento con doxorubicina en comparación con la doxorubicina sola y el tratamiento con Mimic-NC con doxorubicina (Figura 27A). De manera similar, el Mimic-4732 produjo una disminución de los niveles de LDH en el medio y un menor porcentaje de células en apoptosis tras el tratamiento con doxorubicina (Figura 27B-D). También se comprobó el efecto del miR-4732-3p sobre el estrés oxidativo causado por la doxorubicina en los NRCM. Se observó que el tratamiento con el Mimic-4732 produjo una disminución de los niveles

totales de ROS, medido mediante la tinción con DCFH-DA, y también una disminución del superóxido mitocondrial, medido con MitoSOX® (Figura 27E-H). Por último, se observó que los NRCM tratados con el Mimic-4732 tenían una expresión más elevada de *Nfe2l2* y *Nrf1*, dos factores de transcripción que regulan la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la respuesta a daño por radicales libres (Figura 27I, J).

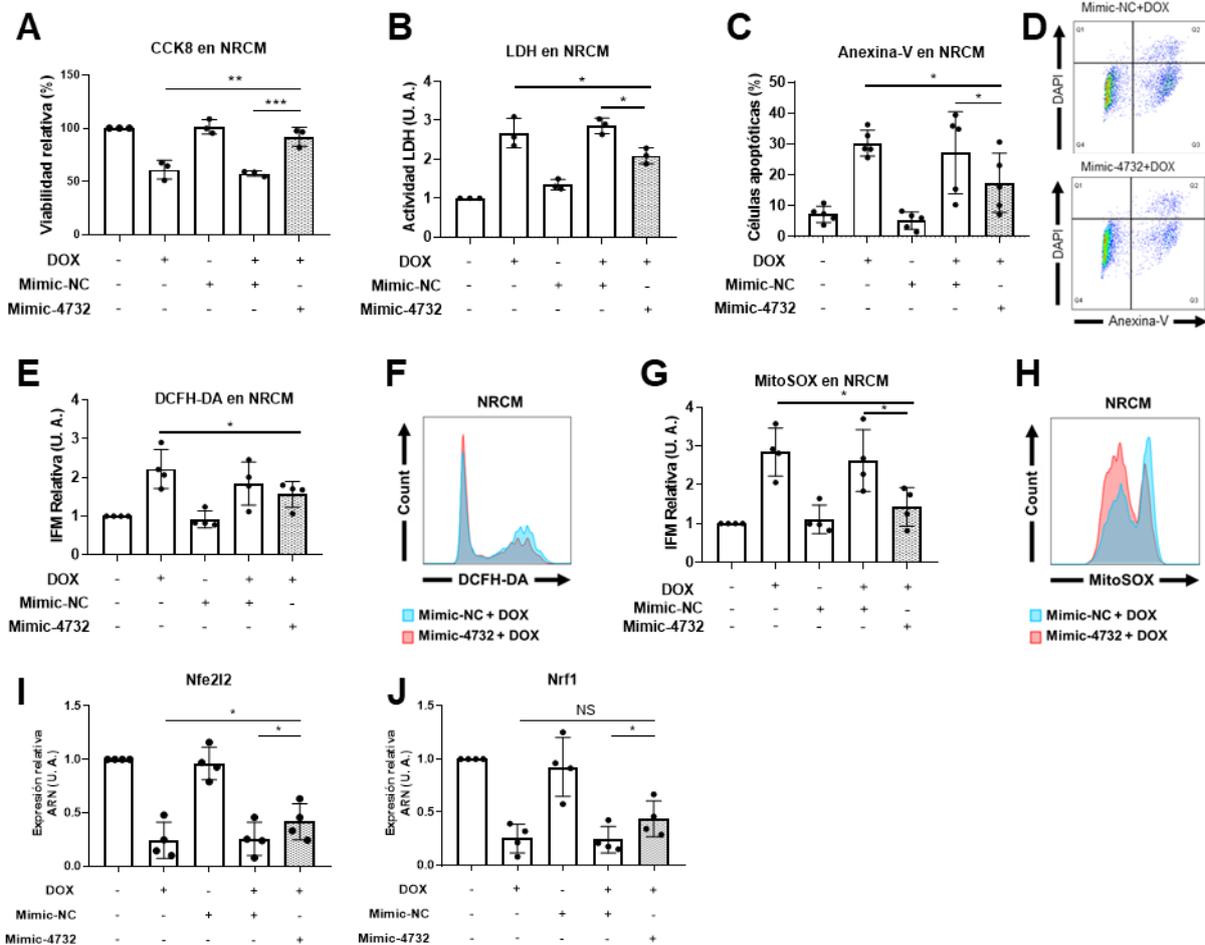


Figura 27. Efecto del miR-4732-3p en NRCM tratados con doxorubicina. Las células se transfectaron con Mimic-NC o Mimic-4732 (40 nM) y después se trataron con doxorubicina (1 μ M durante 48 h). **A**) Viabilidad relativa de los NRCM, medido mediante CCK8. **B**) Actividad lactato deshidrogenasa medida en el medio de cultivo de las células. **C**) Porcentaje de cardiomiocitos en apoptosis. **D**) Imágenes representativas de las citometrías de flujo empleadas para la cuantificación de la apoptosis, mostrando los niveles de células positivas para la anexina-V y el DAPI. **E**) Cuantificación de ROS celulares totales en NRCM transfectadas con el Mimic-NC o el Mimic-4732 (40 nM) y tratadas con doxorubicina (5 μ M durante 24 h). Las células se tiñeron con DCFH-DA y se analizaron por citometría de flujo. **F**) Imágenes representativas de citometría de flujo mostrando la intensidad de fluorescencia media (IFM). **G**) Cuantificación de los niveles de superóxido mitocondrial en NRCM transfectadas como en E). Las células se tiñeron con MitoSOX® y la intensidad de fluorescencia fue analizada por citometría de flujo. **H**)

Imágenes representativas de citometría de flujo mostrando la IFM de las células teñidas con MitoSOX®. I, J) Niveles de *Nfe2l2* y *Nrf1* en NRCM tratados con Mimic-NC o Mimic-4732 (40 nM) y doxorubicina (5 μ M durante 24 h). Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, NS = no significativo.

5.2 Efecto del miR-4732-3p frente al daño por doxorubicina en fibroblastos cardíacos de rata

También quisimos estudiar si el miR-4732-3p protegía los fibroblastos cardíacos de rata (RCF) frente al daño por doxorubicina. Los RCF también se aislaron de corazones de ratas neonatales. Los RCF se transfectaron con Mimic-NC o Mimic-4732 y se trataron con doxorubicina. Se obtuvieron resultados similares a los observados en los NRCM. La sobreexpresión del miR-4732-3p produjo un aumento de la viabilidad de los RCF, así como una disminución de los niveles de apoptosis (Figura 28A-C). Asimismo, el miR-4732-3p también tuvo un efecto antioxidante en los RCF tras el tratamiento con doxorubicina como demuestran las tinciones con DCFH-DA y MitoSOX® (Figura 28D-G).

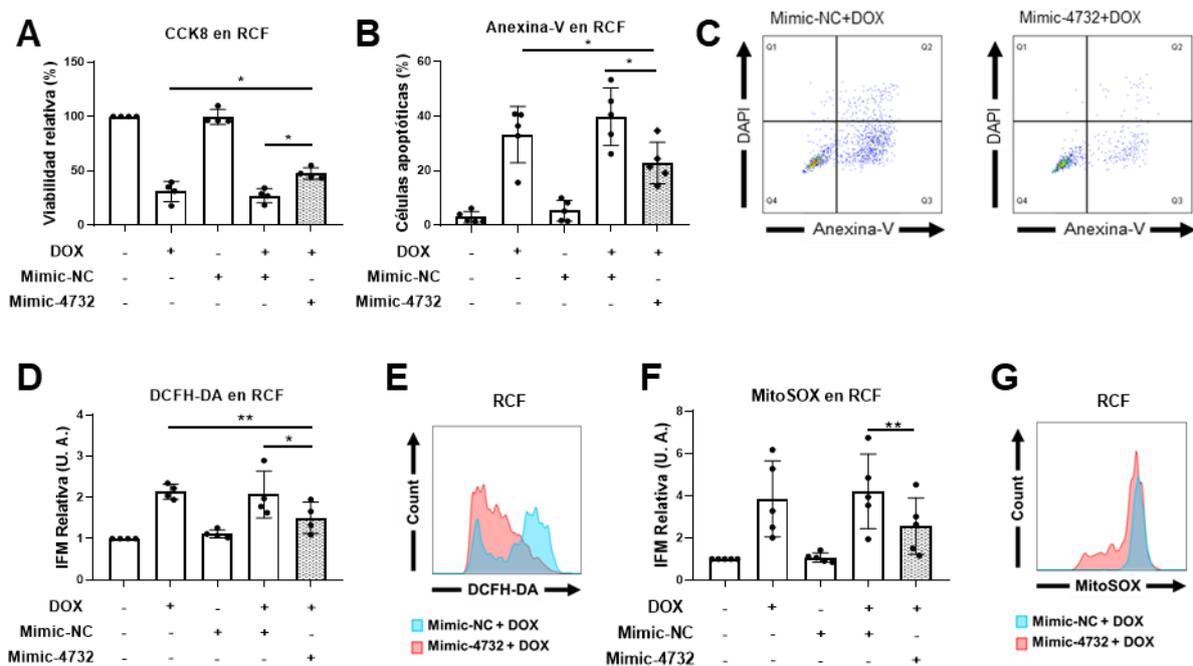


Figura 28. Efecto del miR-4732-3p en RCF tratados con doxorubicina. Las células fueron transfectadas con Mimic-NC o Mimic-4732 y tratadas posteriormente con doxorubicina 1 μ M durante 48 h. **A)** Viabilidad relativa de los RCF, medido por CCK8. **B)** Porcentaje de fibroblastos cardíacos en apoptosis. **C)** Imágenes representativas de las citometrías de flujo empleadas para la cuantificación de la

apoptosis, mostrando los niveles de células positivas para la anexina-V y el DAPI. **D)** Cuantificación de ROS celulares totales en RCF transfectadas con el Mimic-NC o el Mimic-4732 (40 nM) y tratadas con doxorubicina (5 μ M durante 24 h). Las células se tiñeron con DCFH-DA y se analizaron por citometría de flujo. **F)** Imágenes representativas de citometría de flujo mostrando la intensidad de fluorescencia media. **G)** Cuantificación de los niveles de superóxido mitocondrial en RCF tratadas como en E). Las células se tiñeron con MitoSOX® y la intensidad de fluorescencia fue analizada por citometría de flujo. **H)** Imágenes representativas de citometría de flujo mostrando la IFM de las células teñidas con MitoSOX®. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, NS = no significativo.

6. Estudio del papel cardioprotector del miR-4732-3p *in vivo*

6.1 Expresión del miR-4732-3p en diferentes órganos

En primer lugar, quisimos estudiar la expresión del miR-4732-3p en diferentes órganos utilizando ratas Wistar de 30 días de edad (Figura 29A). Se pudo comprobar que el miR-4732-3p se encuentra significativamente más expresado en corazón comparado con bazo, pulmón, hígado y cerebro. Además, se encuentra más expresado en cerebro e hígado comparado con bazo y pulmón, órganos en los que el miR-4732-3p apenas se expresa. También se estudió la expresión del miR-4732-3p en corazón en ratas de diferentes edades (Figura 29B). Se observó que la expresión del miR-4732-3p aumenta con la edad en las ratas, siendo baja a día 0 y día 7, aumentando significativamente a día 30 y siendo más alta a día 90.

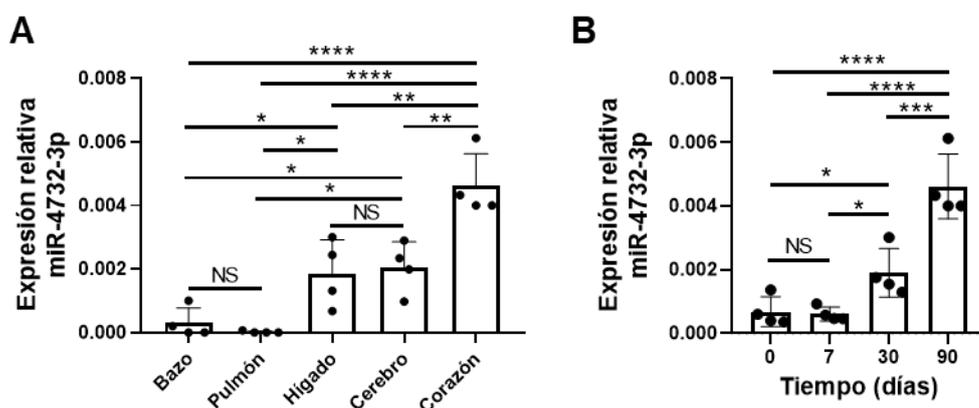


Figura 29. Expresión del miR-4732-3p en diferentes tejidos de ratas Wistar **A)** Expresión del miR-4732-3p en diferentes órganos de ratas Wistar adultas. **B)** Expresión del miR-4732-3p en corazón de ratas

Wistar a día postnatal 0, 7, 30 y 90. Los niveles de miR-4732-3p se relativizaron a los niveles del ARN nuclear pequeño U6. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, NS = no significativo.

6.2 Efecto del miR-4732-3p sobre la función cardíaca después del tratamiento con doxorrubicina

Quisimos estudiar el efecto del miR-4732-3p sobre la función cardíaca en ratas Wistar tratadas con doxorrubicina durante un periodo prolongado de tiempo. Las ratas fueron administradas con 2 mg/kg de doxorrubicina de forma intraperitoneal semanalmente por un total de seis semanas (dosis acumulada de 14 mg/kg). Un grupo recibió en las semanas 2 y 4 0,3 μ g/kg de Mimic-4732 en una emulsión liposomal, administrado de forma intravenosa (Figura 30A). Los resultados se compararon con ratas administradas con salino. Siete semanas después de iniciar el tratamiento con doxorrubicina se midieron diferentes parámetros cardíacos mediante ecocardiografía para analizar el daño causado por doxorrubicina. Primero, se observó que los animales tratados con el Mimic-4732 experimentaron una menor pérdida de peso que los del grupo control (Figura 30B). El grupo tratado con el Mimic-4732 también experimentó una preservación de la función sistólica, calculado mediante el cambio porcentual de área (CPA; Figura 30C). Se observó que en ambos grupos el CPA era significativamente más bajo entre los niveles basales y los niveles medidos a las 7 semanas de iniciar el tratamiento con doxorrubicina, pero el CPA a las 7 semanas del grupo tratado con el Mimic-4732 era significativamente más alto que el grupo inyectado con salino. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la fracción de acortamiento (FA) de las ratas tratadas con Mimic-4732 a las 7 semanas de tratamiento con doxorrubicina comparadas con el grupo control (Figura 30D). No obstante, sí que se observó una tendencia hacia la cardioprotección, ya que la FA de las ratas control experimentó una bajada significativa entre la FA basal y la FA a las 7 semanas, mientras que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la FA basal y a las 7 semanas en el grupo tratado con el Mimic-4732. Además, se estudió la expresión del miR-4732-3p en muestras de plasma de ratas tratadas con doxorrubicina y doxorrubicina + Mimic-4732, comparadas con la expresión en ratas sin tratamiento con doxorrubicina (Figura 30E). Se demostró que la doxorrubicina produce un incremento en los niveles de miR-4732-3p en plasma. Los niveles de miR-4732-3p en el grupo

inyectado con el Mimic-4732 fueron más altos, aunque no se observaron diferencias significativas con el grupo inyectado solo con doxorubicina.

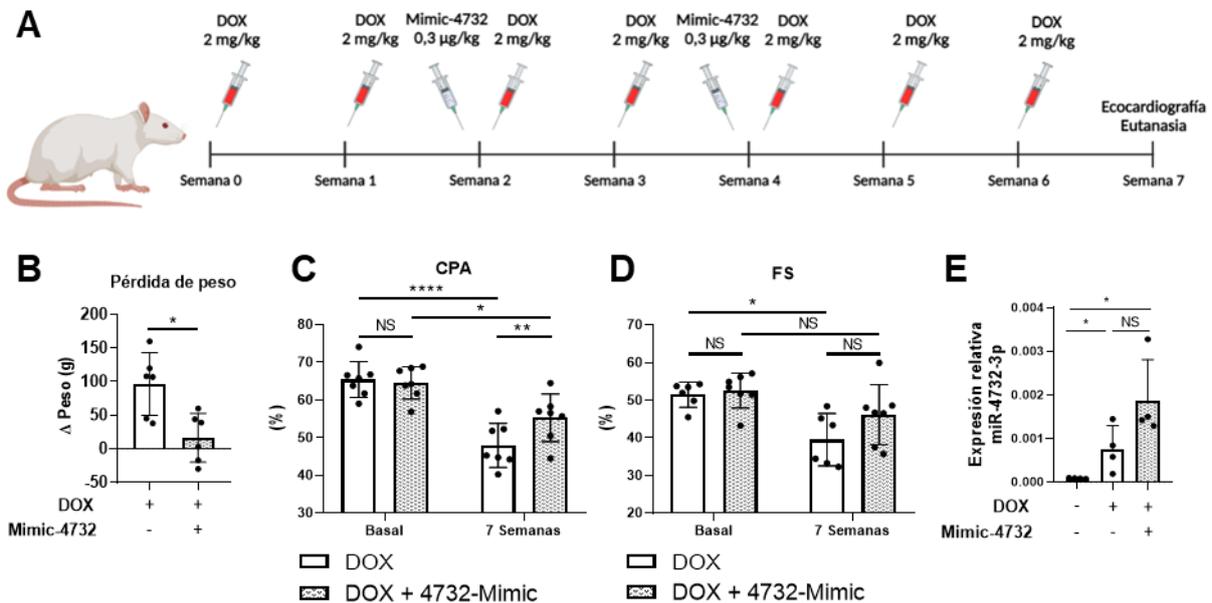


Figura 30. Efecto del miR-4732-3p sobre la función cardíaca de ratas Wistar tratadas con doxorubicina. **A)** Esquema del tratamiento con doxorubicina y administración del Mimic-4732. **B)** Pérdida de peso en animales tratados con doxorubicina después de la inyección intravenosa de suero salino o Mimic-4732 ($n = 6$). **C)** Efecto del miR-4732-3p en el cambio porcentual de área de ratas tratadas con doxorubicina ($n = 7$). **D)** Efecto del miR-4732-3p en la fracción de acortamiento de ratas tratadas con doxorubicina ($n = 7$). **E)** Niveles de miR-4732-3p en plasma. Los datos han sido representados como la media \pm S.D. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, NS = no significativo.

6.3 El miR-4732-3p disminuye el estrés oxidativo y la apoptosis causada por doxorubicina en el corazón *in vivo*

Para profundizar en el efecto cardioprotector del miR-4732-3p frente al daño por doxorubicina *in vivo* se estudiaron los niveles de estrés oxidativo y apoptosis en cortes de corazón de ratas control, tratadas con doxorubicina y tratadas con doxorubicina y Mimic-4732. El estudio del estrés oxidativo *in vivo* se llevó a cabo realizando una tinción frente al 4-hydroxynonenal (4-HNE), un producto de la peroxidación lipídica en las células, que aumenta como consecuencia del estrés oxidativo. Se observó que las ratas tratadas con el Mimic-4732 y doxorubicina tenían unos niveles significativamente más bajos que las ratas tratadas solamente con doxorubicina (Figura 31A, B). Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo

de ratas control y el grupo tratado con doxorubicina y el Mimic-4732. Para estudiar los niveles de apoptosis en los cortes de corazón se llevó a cabo una tinción de terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL), que es un método que marca los fragmentos de ADN que se producen en las células apoptóticas. Se observó que el tratamiento con doxorubicina incrementa los niveles de apoptosis en corazón comparado con las ratas control. No obstante, la administración de Mimic-4732 durante el tratamiento con doxorubicina disminuyó el número de células en apoptosis comparado con los animales tratados únicamente con doxorubicina (Figura 31C, D).

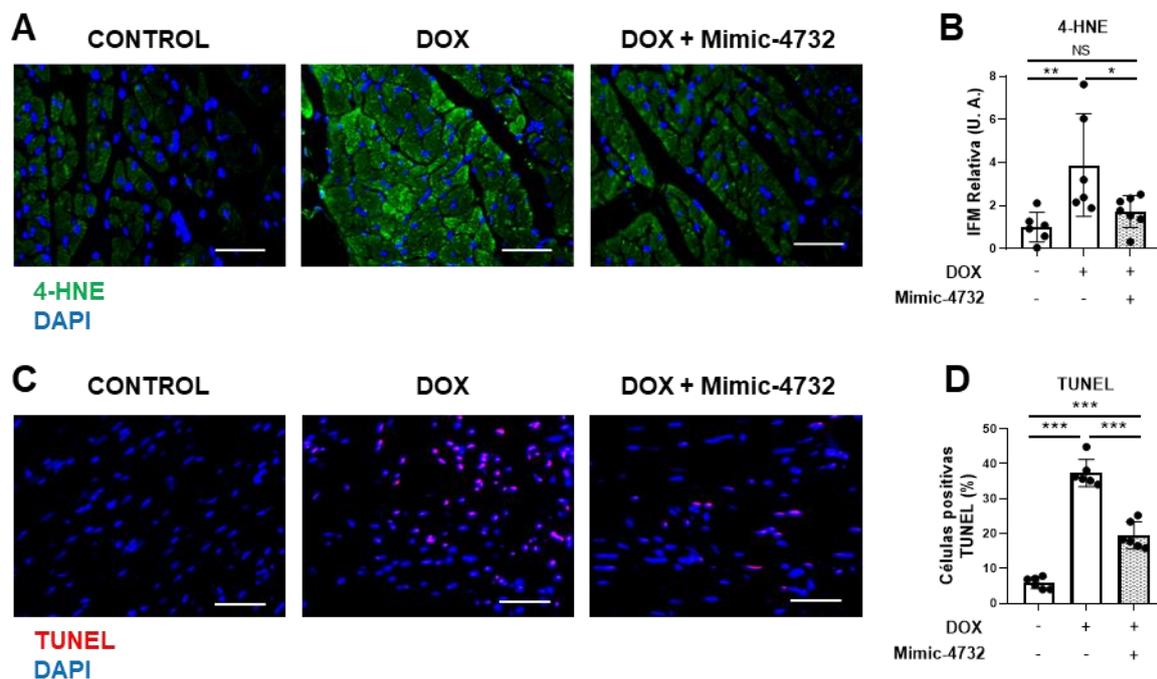


Figura 31. Efecto del miR-4732-3p en el estrés oxidativo y la apoptosis de corazones de ratas tratadas con doxorubicina. **A)** Imágenes representativas de secciones de corazón teñidas con anticuerpos frente al 4-HNE (en verde). La barra de escala es de 100 μ m. **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media del 4-HNE en las secciones de corazón (n = 6). **C)** Imágenes representativas de secciones de corazón teñidas con TUNEL (en rojo). La barra de escala es de 100 μ m. **D)** Cuantificación de las células positivas para TUNEL expresado en porcentaje de células en apoptosis frente al total de células cardíacas (n = 6). Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * p < 0,05, ** p < 0.01, *** p < 0,001, NS = no significativo.

6.4 Efecto del miR-4732-3p en la vascularización del corazón tras el tratamiento con doxorrubicina

En un estudio previo de nuestro grupo se observó que el miR-4732-3p favorecía la vascularización tanto *in vitro* como *in vivo*. Por este motivo, se estudió la vascularización en cortes de corazón de ratas tratadas con el Mimic-4732 y doxorrubicina. Se observó que el Mimic-4732 aumenta la vascularización del corazón tras el tratamiento con doxorrubicina, medido mediante densidad de vasos sanguíneos (tinción frente a la caveolina; Figura 32A, B).

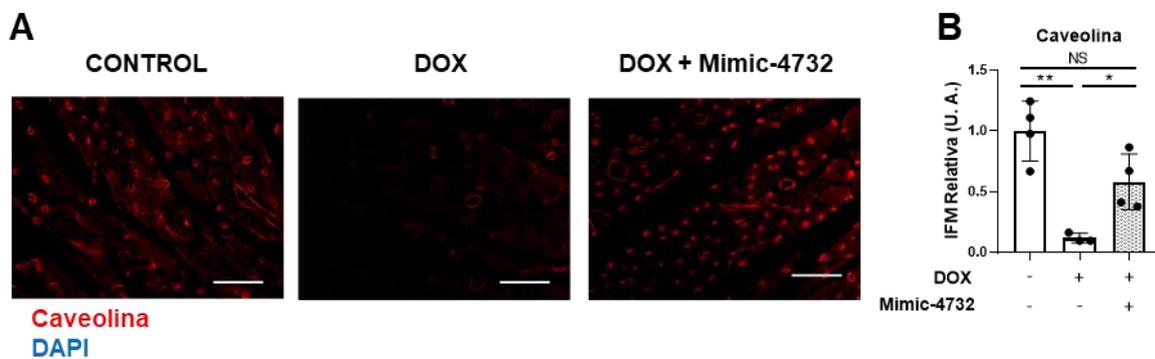


Figura 32. Efecto del miR-4732-3p en la vascularización del corazón después del tratamiento con doxorrubicina. **A)** Imágenes representativas de secciones de corazón teñidas con anticuerpos frente a la caveolina (en rojo). La barra de escala es de 100 µm. **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media de la caveolina en las secciones de corazón (n = 4). Los datos han sido representados como la media ± S. D. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, NS = no significativo.

6.5 Efecto del miR-4732-3p del área transversal de los cardiomiocitos tras el tratamiento con doxorrubicina

Se ha descrito que varios microARNs son capaces de regular la hipertrofia cardíaca. Por este motivo, se evaluó si el tratamiento con el Mimic-4732 podía tener algún efecto en la hipertrofia cardíaca después del tratamiento con doxorrubicina. El área transversal de los cardiomiocitos se determinó empleando secciones del corazón teñidas con aglutinina de germen de trigo (WGA) marcada con un fluoróforo rojo, ya que la WGA se une al sarcolema de los cardiomiocitos, marcando el perímetro de las células, permitiendo así calcular su área transversal. No obstante, no se observaron diferencias en el tamaño de los cardiomiocitos entre los diferentes grupos, indicando que ni el

tratamiento con doxorubicina ni la administración del Mimic-4732 produce hipertrofia o atrofia de los cardiomiocitos (Figura 33A, B).

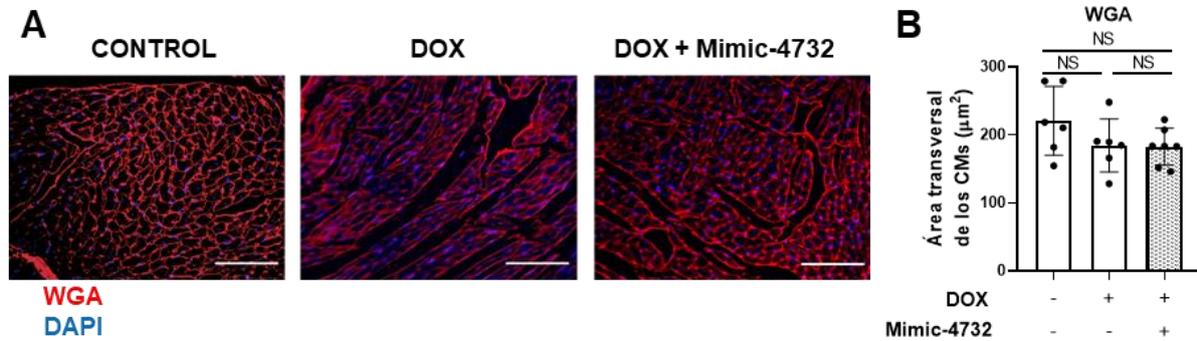


Figura 33. Efecto del Mimic-4732 en el área transversal de los cardiomiocitos de ratas tratadas con doxorubicina. **A)** Imágenes representativas de secciones de corazón teñidas con WGA (en rojo). La barra de escala es de 100 μm . **B)** Cuantificación del área transversal de los cardiomiocitos en las secciones de corazón (n = 6). Los datos han sido representados como la media \pm S. D. NS = no significativo.

6.6 El miR-4732-3p produce una disminución de la fibrosis intersticial causada por la doxorubicina

Por último, se evaluó si el miR-4732-3p podía disminuir la fibrosis intersticial observada en los corazones de las ratas tratadas con doxorubicina. Para ello, se tiñeron secciones de corazón de las ratas control, las tratadas con doxorubicina y las tratadas con doxorubicina + Mimic-4732 con dos tinciones utilizadas para visualizar las fibras de colágeno: el tricrómico de Masson y el rojo sirio (Figura 34A-D). Con ambas tinciones, se observó que los animales tratados con doxorubicina o doxorubicina + Mimic-4732 tenían mayores niveles de tinción (medido como área fibrótica). No obstante, el grupo tratado con el Mimic-4732 mostró un área fibrótica significativamente menor el grupo tratado solamente con doxorubicina en ambas tinciones. El principal evento que dispara el proceso fibrótico en el corazón es la activación de los fibroblastos, los cuales se diferencian a miofibroblastos y promueven la deposición de matriz extracelular. Por este motivo, se realizó una tinción empleando anticuerpos anti-periostina, un marcador de miofibroblastos y fibrosis. La doxorubicina produjo un incremento de la periostina en el corazón. No obstante, la inyección del Mimic-4732 produjo una disminución de la deposición de periostina en el miocardio (Figura 34E-F).

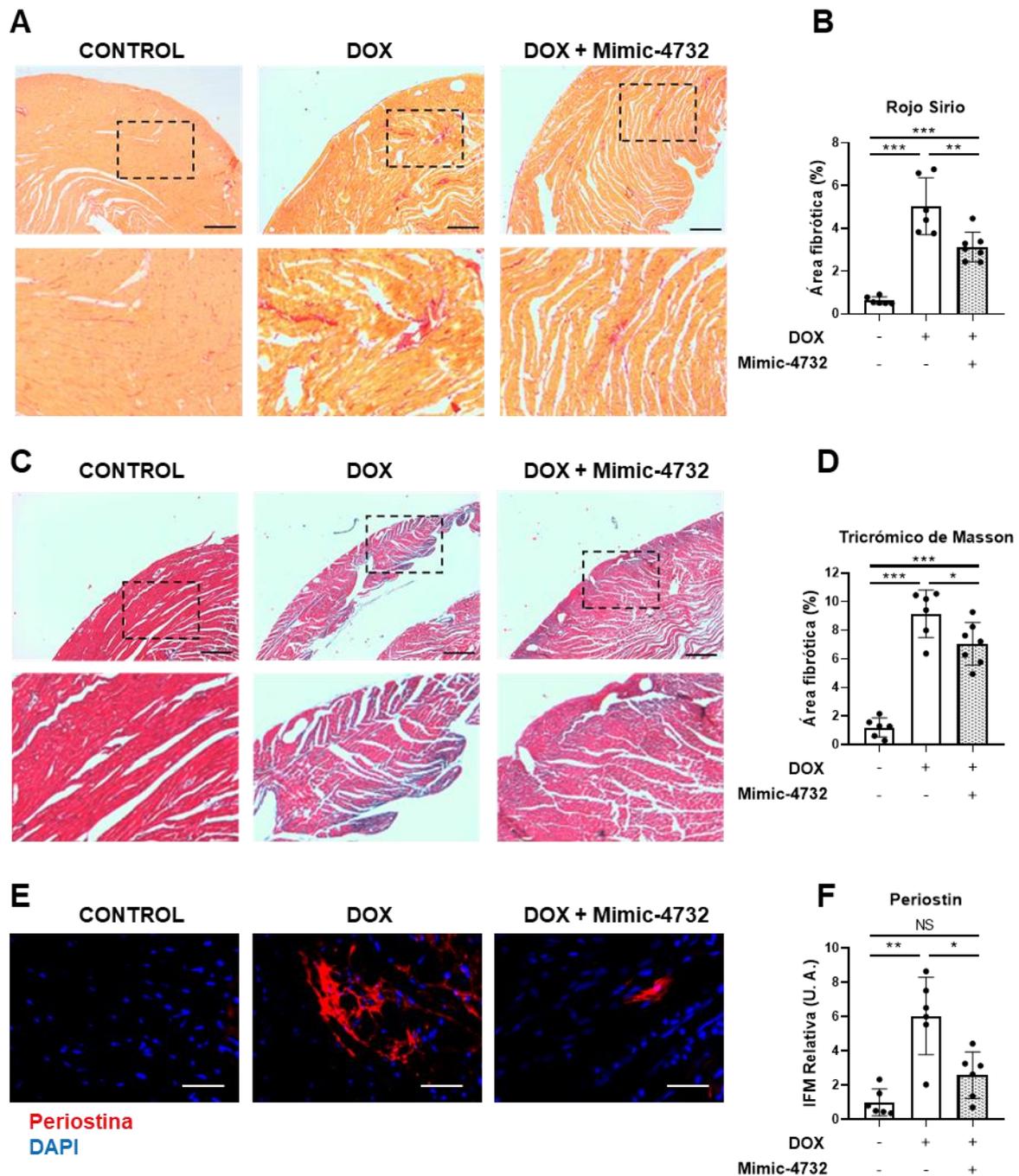


Figura 34. Efecto del miR-4732-3p en la fibrosis cardíaca en ratas tratadas con doxorubicina. **A)** Imágenes representativas de secciones de corazón de ratas tratadas con doxorubicina teñidas con rojo sirio. La barra de escala es de 500 μ m. **B)** Área fibrótica en secciones de corazón teñidas con tricrómico de Masson, calculado como el porcentaje de área roja en el área total de la sección ($n = 6$). **C)** Imágenes representativas de secciones de corazón de ratas tratadas con doxorubicina teñidas con tricrómico de Masson. La barra de escala es de 500 μ m. **D)** Área fibrótica en secciones de corazón teñidas con tricrómico de Masson, calculado como el porcentaje de área azul en el área total de la sección ($n = 6$). **E)** Imágenes representativas de secciones de corazón teñidas con anticuerpos anti-periostina (en rojo). La barra de escala es de 100 μ M. **F)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media de la periostina en las secciones de corazón ($n = 6$). Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$, NS = no significativo.

7. Identificación y validación de genes diana del miR-4732-3p

Para comprender mejor el mecanismo de acción del miR-4732-3p a nivel molecular se decidió explorar, *in silico*, los genes diana y los mecanismos biológicos regulados por este miARN. En primer lugar, se obtuvieron los términos GO (*Gene Ontology*) significativamente enriquecidos entre los posibles genes diana utilizando la herramienta miRWalk. Los genes seleccionados y sus intersecciones se han representado empleando un diagrama UpSet para mostrar una vista general de los términos GO más relevantes relacionados con el miR-4732-3p (Figura 35A). Observamos una superposición considerable de genes diana pertenecientes a la vía de señalización del TGF- β , lo que los hace candidatos interesantes para su validación. Se utilizó la herramienta GeneTrail para buscar miARNs que pudieran tener genes diana comunes con el miR-4732-3p, y se encontraron los miARNs miR-29b-3p, miR-125-5p, miR-145-5p y el miR-155-5p. Como los miARNs puede actuar en conjunto para regular la expresión de sus genes diana, se llevó a cabo un interactoma empleando los genes diana comunes y los 5 miARNs para visualizar los procesos biológicos en los que participan (Figura 35B). Los procesos biológicos se representaron empleando la herramienta Cytoscape. Desafortunadamente, los nodos identificados señalaban procesos biológicos amplios que no podían ser relacionados con facilidad al efecto cardioprotector del miR-4732-3p *in vivo* e *in vitro*.

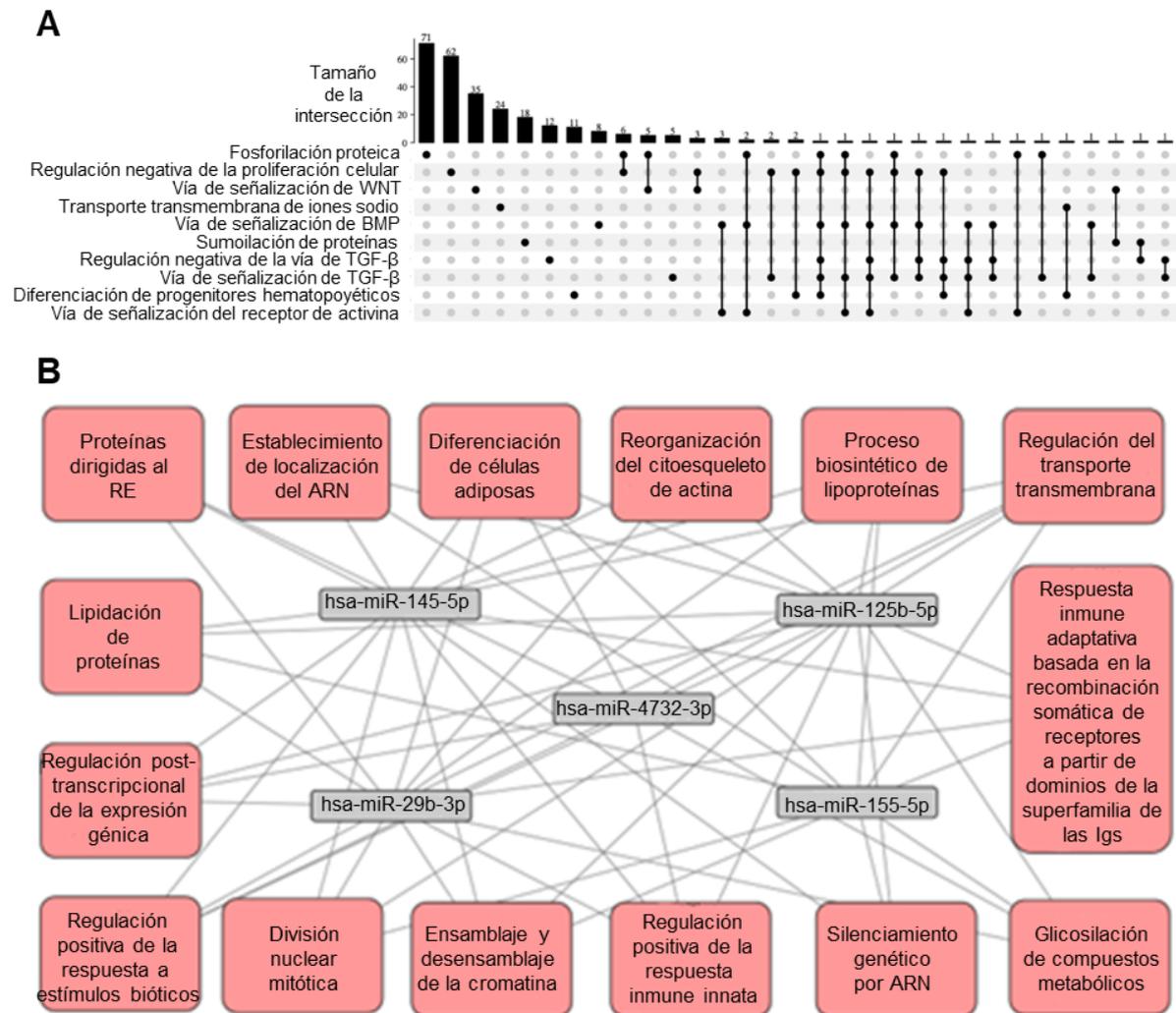


Figura 35. Estudio *in silico* de los genes diana del miR-4732-3p. **A)** Términos GO entre los posibles genes diana del miR-4732-3p y sus intersecciones. **B)** Interactoma de los genes diana combinados del miR-4732-3p, el miR-145-5p, el miR-125b-5p, el miR-29b-3p y el miR-155-5p.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in silico*, decidimos estudiar genes diana involucrando las vías de señalización de TGF- β e Hippo para ver si podían ayudar a comprender mejor el efecto protector del miR-4732-3p. Para ello, se validó la diana previamente identificada Smad2²³⁷, junto con YAP (yes-associated-protein 1) y su forma fosforilada (p-YAP) como efectores de la vía de señalización no canónica de Wnt e Hippo, las cuales están relacionadas con la regeneración cardíaca^{238–240}. La validación e identificación de los genes diana fue llevada a cabo en fibroblastos cardíacos humanos (HCF) y en cardiomiocitos derivados de iPSC. Los HCF y los hiPSC-CM se transfectaron con el Mimic-4732 o el Mimic-NC empleando lipofectamina. En ambas líneas se observó un marcado aumento de la expresión del miR-4732-3p tras

la transfección (Figura 36C). La modulación de los niveles de Smad2 solo se observó en los hiPSC-CM (Figura 36A, B), mientras que en ambas líneas celulares se observó que el miR-4732-3p produce una disminución de la expresión de p-YAP (Figura 36A, B), indicando que YAP no es una diana del miR-4732-3p, pero este miARN es capaz de modular su activación reduciendo los niveles de su forma fosforilada.

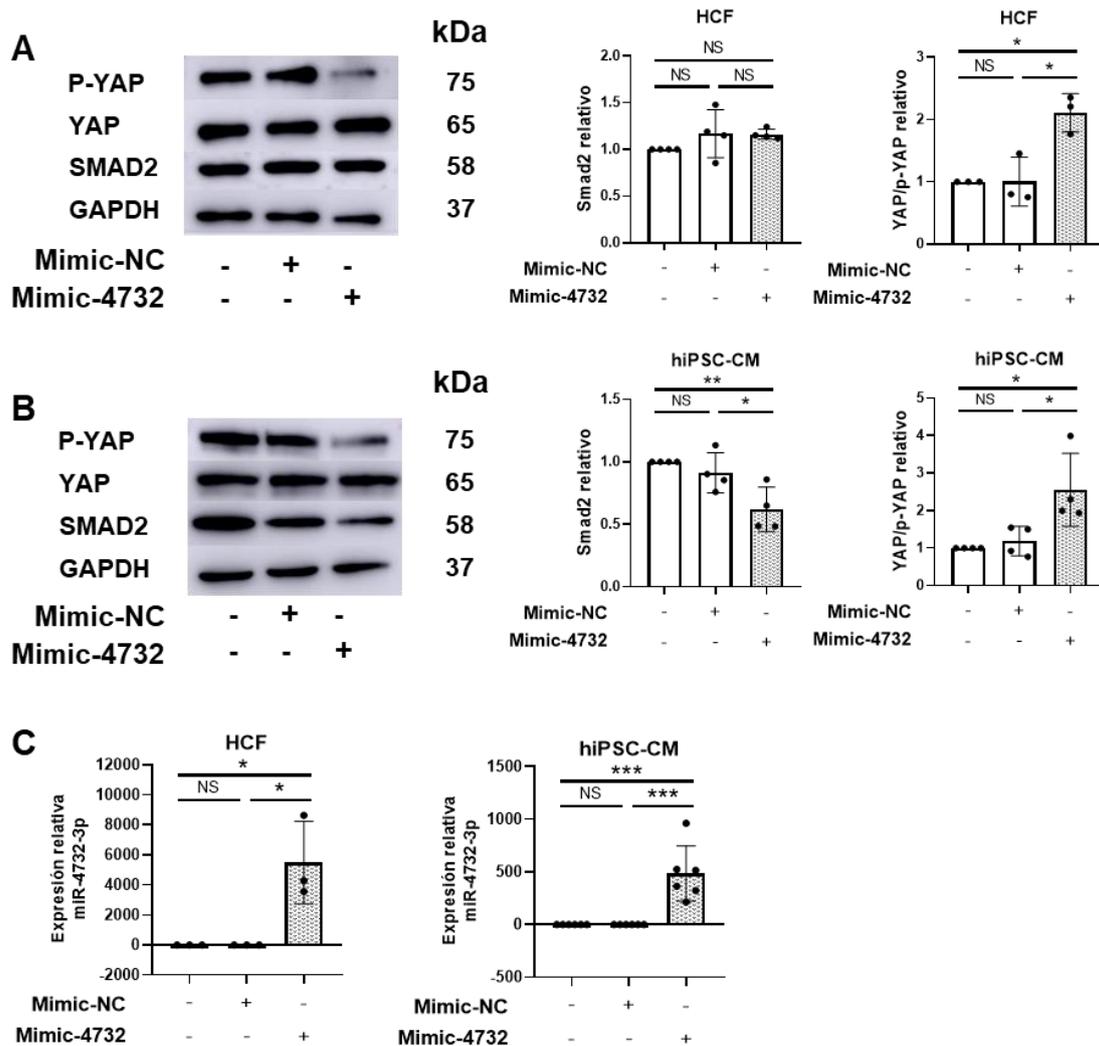


Figura 36. Modulación de los niveles de Smad2, YAP y p-YAP por parte del miR-4732-3p. **A)** Imágenes representativas de Western Blot de p-YAP, YAP y Smad2 en HCF transfectados y sin transfectar con Mimic-4732 o Mimic-NC. Los niveles de estas proteínas fueron cuantificados por densitometría y relativizados al control sin transfectar. El Gapdh fue utilizado como control de carga. **B)** Imágenes representativas de Western Blot de p-YAP, YAP y Smad2 en hiPSC-CM transfectados y sin transfectar con Mimic-4732 o Mimic-NC. Los niveles de estas proteínas fueron cuantificados por densitometría y relativizados al control sin transfectar. El Gapdh fue utilizado como control de carga. **C)** Expresión relativa del miR-4732-3p en HCF y hiPSC-CM transfectados y sin transfectar con Mimic-NC o Mimic-4732. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$, NS = no significativo.

8. Efecto de la sobreexpresión del miR-4732-3p sobre la viabilidad de los cardiomiocitos CTRL y CTX tratados con doxorubicina

Finalmente, se quiso estudiar si el miR-4732-3p tenía un efecto cardioprotector en los hiPSC-CM de los pacientes oncológicos pediátricos que tuvieron cardiotoxicidad como consecuencia de su tratamiento con antraciclinas. Para ello los hiPSC-CM tanto CTRL como CTX fueron transfectados con el Mimic-4732 o el Mimic-NC a una dosis de 40 nM previamente al tratamiento con doxorubicina. Con fines comparativos también se añadió un grupo tratado con dexrazoxano, que actualmente es uno de los fármacos cardioprotectores cuyo uso está aprobado en pacientes que vayan a ser sometidos a un tratamiento con antraciclinas. Se pudo observar que, tanto en los cardiomiocitos CTRL como los CTX la transfección con Mimic-NC o Mimic-4732 producían una bajada de la viabilidad de aproximadamente el 10% (Figura 37A, B), por lo que la transfección estaba teniendo un efecto tóxico sobre estos cardiomiocitos. En el caso de los cardiomiocitos CTRL, no se observaron diferencias significativas entre los hiPSC-CM tratados solamente con doxorubicina y los hiPSC-CM tratados con doxorubicina y el Mimic-4732. No obstante, el miR-4732-3p sí que produjo una mejora significativa de la viabilidad de los hiPSC-CM tratados con doxorubicina comparado con el grupo transfectado con el Mimic-NC. Por otro lado, en los hiPSC-CM CTX tampoco se observan diferencias significativas entre los cardiomiocitos tratados solamente con doxorubicina y los tratados con doxorubicina y el miR-4732-3p. Además, en este caso la sobreexpresión del miR-4732-3p no produjo una mejora significativa de la viabilidad de los cardiomiocitos tratados con doxorubicina si lo comparamos con los cardiomiocitos transfectados con el Mimic-NC, también tratados con doxorubicina. Por otra parte, tanto en los cardiomiocitos CTRL como en los CTX se observó que el dexrazoxano produjo una mejora significativa de la viabilidad cuando se comparaba con los hiPSC-CM solamente tratados con doxorubicina, mientras que no se observaron diferencias entre el grupo tratado con dexrazoxano y doxorubicina y los tratados con Mimic-4732 y doxorubicina.

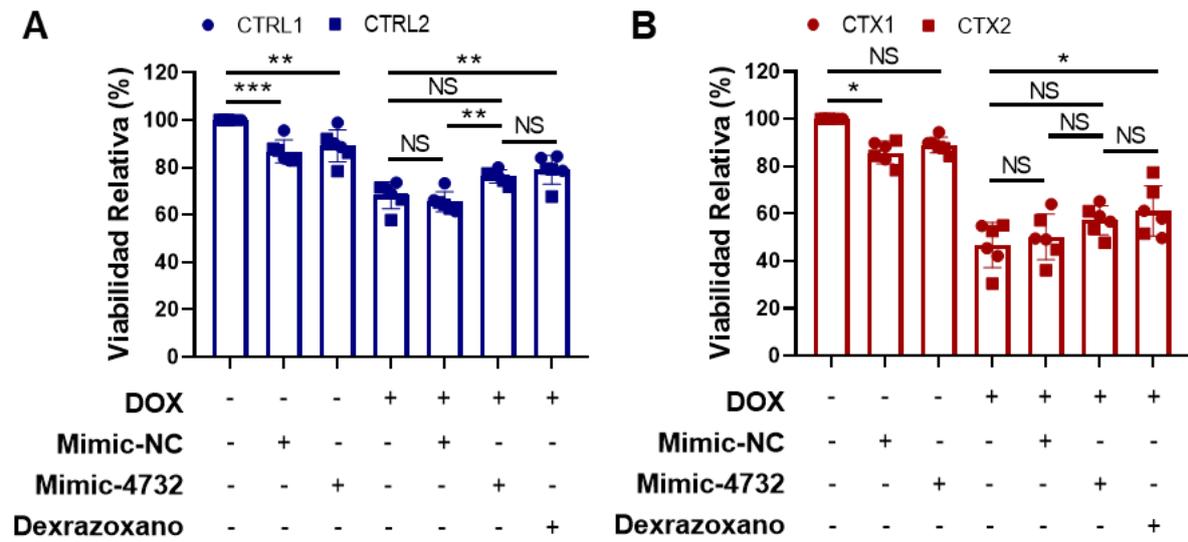


Figura 37. Efecto de la sobreexpresión del miR-4732-3p sobre la viabilidad de cardiomiocitos CTRL (A) y CTX (B) tratados con doxorubicina. Los datos han sido representados como la media \pm S. D. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, NS = no significativo.

Discusión

1. Los hiPSC-CM CTX recapitulan la susceptibilidad al daño por doxorubicina observada en los pacientes pediátricos

El descubrimiento de las células madre pluripotentes inducidas por parte de Yamanaka y Takahashi¹⁰⁰ ha supuesto uno de los mayores avances para la investigación biomédica tanto básica como traslacional, ya que las iPSC tienen el potencial para diferenciarse a cualquier tipo celular humano, exceptuando los tejidos extraembrionarios. Esto posibilita, por una parte, el estudio *in vitro* de tipos celulares humanos que sería imposible obtener de otra manera, como cardiomiocitos o neuronas, constituyendo nuevos modelos para comprender mejor la fisiología y el desarrollo humano. Por otra parte, también es posible derivar hiPSC específicas de pacientes con patologías concretas, permitiendo la generación de modelos celulares específicos de enfermedad y paciente, los cuales pueden ser utilizados para investigar las bases moleculares de la enfermedad, la búsqueda de nuevos fármacos o estudios de citotoxicidad. Por último, las hiPSC pueden ser utilizadas directamente como agentes terapéuticos en el contexto de la terapia celular.

En este trabajo se han empleado hiPSC derivadas de pacientes oncológicos pediátricos que experimentaron cardiotoxicidad inducida por antraciclinas de manera temprana. Estas hiPSC se diferenciaron a cardiomiocitos empleando un protocolo que implica la modulación de la vía de señalización de WNT²³⁰ y los hiPSC-CM obtenidos han sido utilizados para modelar la cardiotoxicidad inducida por la doxorubicina. Como controles se emplearon cardiomiocitos obtenidos de hiPSC derivadas de niños sanos.

En primer lugar, se estudió la susceptibilidad de los cardiomiocitos CTRL y CTX frente a la doxorubicina en términos de viabilidad celular y apoptosis. Se pudo observar que en el rango de dosis de 1 a 20 μ M de doxorubicina la viabilidad de los cardiomiocitos CTX es significativamente menor que en los cardiomiocitos CTRL. De hecho, la IC₅₀ de los cardiomiocitos CTRL es aproximadamente el doble que en los cardiomiocitos CTX. Los cardiomiocitos CTX también mostraron una mayor liberación de LDH al medio de cultivo tras el tratamiento con doxorubicina, así como un mayor porcentaje de células en apoptosis, comparados con los CTRL. Estos resultados concuerdan con lo observado en el estudio de Burridge *et al.*¹⁷⁷, en el cual demuestran que los cardiomiocitos obtenidos de hiPSC derivadas de pacientes con cáncer de mama que

experimentaron cardiotoxicidad inducida por antraciclinas también son más sensibles al tratamiento con doxorubicina *in vitro* que los cardiomiocitos derivados de pacientes que no experimentaron cardiotoxicidad. También son coherentes con el trabajo llevado a cabo por Kitani *et al.*¹⁷⁸, en el cual estudian otro compuesto cardiotóxico, el trastuzumab, y observan que los cardiomiocitos obtenidos de pacientes que sufrieron disfunción cardíaca severa tras el tratamiento con trastuzumab son más sensibles al trastuzumab *in vitro*.

Para comprender mejor porqué la doxorubicina produce un mayor incremento de la apoptosis en los cardiomiocitos CTX respecto a los CTRL se decidió estudiar los niveles de caspasa después del tratamiento con doxorubicina, ya que estas proteínas son las efectoras de la apoptosis²⁴¹. De hecho, la activación de la caspasa-3 mediada por doxorubicina es un proceso bien caracterizado²⁴²⁻²⁴⁴. En nuestro estudio observamos que la doxorubicina produce un incremento notable de los niveles de caspasa-3 activa en los cardiomiocitos CTX, siendo este mucho más moderado en los CTRL, indicando que la activación de la caspasa-3 es un proceso clave en la susceptibilidad a la doxorubicina. Además, también se puede observar una mayor ratio entre la proteína pro-apoptótica Bax y la anti-apoptótica Bcl-2 en los cardiomiocitos CTX tratados con doxorubicina.

Uno de los principales mecanismos de cardiotoxicidad de la doxorubicina consiste en incrementar el estrés oxidativo⁶⁶. Por ello, se determinaron los niveles de especies reactivas de oxígeno en los hiPSC después del tratamiento con doxorubicina. Se pudo comprobar que tanto los niveles de ROS totales de las células como el superóxido mitocondrial estaban aumentados en los hiPSC-CM CTX tratados con doxorubicina respecto a los CTRL. Además, los niveles de glutatión reducido eran menores en los cardiomiocitos CTX. La depleción de los niveles de GSH aumenta el estrés oxidativo, ya que es un componente fundamental para los procesos de eliminación de ROS²⁴⁵. Para entender mejor las diferencias observadas en los niveles de ROS entre los cardiomiocitos CTX y los CTRL tras el tratamiento con doxorubicina, decidimos estudiar la expresión de varios genes relacionados con la detoxificación de especies reactivas de oxígeno. Sorprendentemente, observamos que los niveles de *NQO2* eran superiores en los hiPSC CTX sin tratamiento con doxorubicina. *NQO2* codifica la NRH:quinona oxidorreductasa 2, que se encarga de catalizar la detoxificación de quinonas y protege las células del estrés oxidativo²⁴⁶, por lo que unos niveles superiores de *NQO2* tendrían un efecto protector frente al estrés oxidativo. No obstante, el

tratamiento con doxorubicina inhibe la expresión de *NQO2* tanto en los hiPSC CTX como los CTRL, de manera que no se observaron diferencias en los niveles de *NQO2* después del tratamiento con doxorubicina. También observamos que los niveles de *NOS3*, que codifica la óxido nítrico sintasa 3, estaban incrementados en los hiPSC CTX frente a los CTRL en ausencia de tratamiento con doxorubicina. Esto es interesante, ya que se ha descubierto que la variante rs1799983 en el gen *NOS3*, que reduce la producción de óxido nítrico por parte de la óxido nítrico sintasa 3, tiene un efecto protector frente a la doxorubicina en pacientes de riesgo²⁴⁷. Además, ratones *Knock-Out* para la *NOS3* tienen una mayor protección frente al daño por doxorubicina²⁴⁸. No obstante, después del tratamiento con doxorubicina no se observaron diferencias en la expresión de *NOS3* entre cardiomiocitos CTRL y CTX. Tampoco se observaron diferencias en la expresión de *NRF2* entre los diferentes grupos experimentales, pero sí que se observaron diferencias en la expresión de *NRF1*, estando su expresión aumentada en los hiPSC-CTRL respecto a los CTX en condiciones basales. Ambos genes codifican factores transcripcionales que aumentan la expresión de genes antioxidantes²⁴⁹, por lo que unos niveles elevados de *NRF1* podrían tener un efecto protector frente al daño inducido por ROS. Por último, se estudió la expresión de *TXN*, *SOD1* y *CAT*, genes que codifican proteínas encargadas de detoxificar ROS. En el caso de *TXN* no se observaron diferencias, mientras que sí que observamos que los niveles de *SOD1* estaban incrementados en los hiPSC-CM CTRL tratados con doxorubicina respecto a los CTX. *SOD1* codifica la superóxido dismutasa 1, encargada de catalizar la conversión de superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno, siendo una de las principales enzimas encargadas de mantener la homeostasis redox celular²⁵⁰. Estas diferencias en la expresión génica fueron confirmadas a nivel de proteína mediante Western Blot, por lo que unos niveles de superóxido dismutasa 1 más elevados en los hiPSC-CM CTRL después del tratamiento con doxorubicina respecto a los CTX podrían explicar en parte las diferencias observadas en los niveles de ROS celulares. También observamos diferencias en la expresión de *CAT*, que codifica la catalasa, encargada de convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno²⁵¹, estando sus niveles aumentados en hiPSC-CM CTRL tanto en ausencia como presencia de doxorubicina respecto a los CTX. No obstante, estas diferencias no se observaron por Western Blot.

En 2012 Zhang *et al.* demostraron que el daño genómico causado por la doxorubicina en forma de rupturas de doble cadena en el ADN como consecuencia de su interacción con la Top2 β tenía un papel fundamental en la cardiotoxicidad inducida por la

doxorubicina⁵⁶. En este sentido, quisimos estudiar el daño genotóxico en los hiPSC-CM CTRL y CTX después del tratamiento con doxorubicina. Para ello, estudiamos los niveles de la p-histona γ -H2AX, ya que este es un marcador de rupturas de doble cadena en el ADN²⁵². Se observó tanto por inmunofluorescencia como por Western Blot que los niveles de p-histona γ -H2AX eran más elevados en los hiPSC-CM CTX tras el tratamiento con doxorubicina respecto a los cardiomiocitos control. Por otra parte, en numerosos estudios se ha visto que la doxorubicina induce daño mitocondrial²⁵³. Para estudiar el daño mitocondrial en los cardiomiocitos se realizó una tinción con JC-1, que actúa como un sensor del potencial de membrana mitocondrial. Se pudo comprobar que las mitocondrias de los hiPSC-CM CTRL tratados con doxorubicina tenían una menor pérdida del potencial de membrana mitocondrial que las mitocondrias de los hiPSC-CTX. Estos resultados mostraron que los hiPSC-CTX tienen unos mayores niveles de daño genotóxico y mitocondrial causados por el tratamiento con doxorubicina que los hiPSC-CTRL, lo que concuerda con la mayor susceptibilidad a la doxorubicina en términos de viabilidad y apoptosis observadas previamente.

La doxorubicina produce la desorganización de los sarcómeros y altera la expresión de diversos genes que codifican proteínas sarcoméricas^{171,177}. Para estudiar el efecto de la doxorubicina sobre los sarcómeros de los cardiomiocitos CTRL y CTX se llevó a cabo una tinción frente a la troponina cardíaca T y la α -actinina sarcomérica, observándose una mayor desorganización de estas proteínas en el caso de los hiPSC-CM CTX. El grado de desorganización fue cuantificado empleando las imágenes de la α -actinina sarcomérica, observándose un mayor porcentaje de desorganización sarcomérica en los hiPSC-CM CTX tratados con doxorubicina respecto de los CTRL. También se estudió la expresión de genes que codifican diversas proteínas relacionadas con el aparato contráctil de los cardiomiocitos. En el caso de los genes que codifican para las cadenas pesadas de la miosina *MYH7* y *MYH6*, se pudo comprobar que tanto en las líneas CTRL como las CTX la doxorubicina produce una regulación a la baja de estos genes. No obstante, los niveles de *MYH7* en los cardiomiocitos CTRL tratados con doxorubicina son significativamente superiores a los niveles de *MYH7* de los cardiomiocitos CTX. Por otra parte, los niveles de *MYL3*, que codifica la cadena ligera de la miosina 3, estaban incrementados en los hiPSC-CM CTX respecto los CTRL tanto en ausencia como presencia de doxorubicina. Esto es interesante, ya que en un estudio de nuevos biomarcadores de cardiotoxicidad se descubrió que la *Myl3* demostraba elevados niveles de sensibilidad y especificidad como biomarcador de cardiotoxicidad²⁵⁴, por lo que niveles elevados de *MYL3* podrían estar relacionados con

la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. Por lo que respecta a los genes *TTN* y *NEBL*, que codifican para la titina y nebulette, respectivamente, no se observaron diferencias entre las líneas de hiPSC-CM CTRL y CTX. En el caso del gen *ACTC1*, que codifica para la α -actinina cardíaca, se pudo observar unos niveles más elevados en los hiPSC-CM CTX en condiciones basales respecto a los CTRL, pero no se observaron diferencias después del tratamiento con doxorubicina. En cuanto a los genes *TNNT2* y *TNNI3*, que codifican para las troponinas cardíacas T e I, respectivamente, no se observaron diferencias en la expresión de *TNNT2* entre los diferentes grupos experimentales, pero sí que se observó una mayor expresión de *TNNI3* en los cardiomiocitos CTX respecto los CTRL en condiciones basales. Esto podría ser relevante ya que se ha visto que los niveles elevados de *TNNI3* podrían tener efectos cardíacos adversos²⁵⁵. No obstante, el tratamiento con doxorubicina produce una fuerte regulación a la baja de *TNNI3* tanto en los cardiomiocitos CTRL como los CTX. Por último, se estudiaron los niveles de *ANK2*, que codifica la anquirina 2. Se observó que los niveles de *ANK2* estaban aumentados en los hiPSC-CTRL respecto los CTX tanto en condiciones basales como después del tratamiento con doxorubicina. Unos mayores niveles de *ANK2* podrían ayudar a preservar la estructura de los sarcómeros, ya que se ha observado que la anquirina 2 conecta los sarcómeros con el sarcolema, contribuyendo a mantener la integridad sarcomérica durante la contracción²⁵⁶. Por otra parte, también se ha observado que mutaciones en el gen de la *ANK2* pueden agravar el síndrome QT largo al interactuar con canales de potasio en la membrana²⁵⁷.

También se ha visto que la doxorubicina puede alterar la expresión de canales iónicos en cardiomiocitos derivados de iPSC¹⁶⁸. En este trabajo hemos estudiado la expresión de diversos canales de sodio, calcio y potasio en los cardiomiocitos CTRL y CTX antes y después del tratamiento con doxorubicina, pero en la mayoría de los canales estudiados no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre cardiomiocitos CTRL y CTX ni tampoco diferencias en la expresión causadas por la doxorubicina. Tan solo se observaron diferencias en el gen *SCN5A*, que codifica un canal de sodio, observándose unos niveles más elevados de este gen en los hiPSC-CM CTX tanto en condiciones basales como después del tratamiento con doxorubicina. Interesantemente, se ha visto que las mutaciones en el gen *SCN5A* pueden relacionarse con la cardiomiopatía dilatada²⁵⁸. Además, estas variantes aumentan la susceptibilidad al daño por doxorubicina *in vivo*.

Como ya se ha comentado en la introducción, la doxorubicina induce la diferenciación de los fibroblastos cardíacos a miofibroblastos, produciendo fibrosis intersticial en el corazón⁶⁷. No obstante, los cardiomiocitos también son capaces de activar programas inflamatorios y fibrogénicos en respuesta al daño²³⁶, por lo que decidimos investigar la expresión de genes de la vía de señalización de TGF- β y genes pro-fibróticos. Se pudo comprobar que tanto en condiciones basales como después del tratamiento con doxorubicina los niveles de los genes de la vía de TGF- β *TGFBR1*, *SMAD2* y *SMAD4* estaban aumentados en los hiPSC-CM CTX respecto a los CTRL. Como la activación de la vía de TGF- β promueve la fibrosis cardíaca, los niveles elevados de mensajero de componentes de esta vía en los hiPSC-CM CTX podrían estimular la fibrosis y el daño en el miocardio²⁵⁹. Además, hemos observado que los niveles de *POSTN* y *FBN1*, que codifican para la periostina y la fibrilina 1, respectivamente, están aumentados en los hiPSC-CM CTX después del tratamiento con doxorubicina respecto a los CTRL. La periostina y la fibrilina 1 son proteínas de matriz extracelular cuya expresión aumenta en el desarrollo de la fibrosis y el remodelado cardíaco^{260,261}, por lo que una mayor expresión de estos genes después del tratamiento con doxorubicina podría aumentar el proceso fibrótico.

También se estudió la expresión de *GDF15* y *CKM*, los cuales codifican para el factor de crecimiento y diferenciación 15 y la creatina quinasa, respectivamente. Hemos observado que la expresión de estos genes se encuentra aumentada en los hiPSC-CM CTX tras el tratamiento con doxorubicina en comparación con los hiPSC-CM control. El aumento de estas proteínas está relacionado con el daño miocárdico en la insuficiencia cardíaca y el infarto de miocardio^{262,263}. Además, *GDF15* forma parte de la superfamilia de proteínas del TGF- β y se ha visto que su expresión es muy elevada en los cardiomiocitos después del daño por isquemia y reperfusión y después del infarto de miocardio, además de verse relacionado con los procesos inflamatorios y la fibrosis cardíaca²⁶⁴. Los resultados obtenidos muestran que *GDF15* también podría tener un papel importante en la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas.

Por último, decidimos estudiar la expresión de diversos miARNs (hsa-miR-1-3p, hsa-miR-22-3p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-90b-3p, hsa-miR-133a-3p, hsa-miR-148a-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-192-5p y hsa-miR-4732-3p) que han mostrado efectos cardioprotectores en diversas patologías cardíacas, para ver si la doxorubicina alteraba su expresión y había diferencias entre los hiPSC-CM CTRL y los CTX. El miR-1-3p y el miR-133a-3p son dos miARNs altamente expresados en los cardiomiocitos^{204,212} y

se ha podido ver que la administración de mimics de estos miARNs tiene un efecto cardioprotector frente a la hipertrofia cardíaca^{209,210,212}. Por otra parte, se ha visto que el miR-30b-5p y el miR-22-3p son capaces de contener la fibrosis en ratones después del infarto de miocardio²⁶⁵. También se ha comprobado que la sobreexpresión del miR-30b-5p en el corazón de ratones transgénicos disminuye el tamaño del infarto y reduce la muerte de cardiomiocitos después del daño por isquemia y reperfusión²⁶⁶. En cuanto al miR-148a-3p, se ha podido comprobar que la transducción de este miARN mediante virus adeno-asociados protege el corazón en un modelo de disfunción sistólica inducida por sobrecarga en ratón, evitando la dilatación ventricular²⁶⁷ y la administración de exosomas derivados de macrófagos M2 con el miR-148a-3p disminuye el daño miocárdico en un modelo de daño por isquemia y reperfusión en rata²⁶⁸. El miR-150-5p tiene un efecto antifibrótico^{269,270} y su administración disminuye la muerte de los cardiomiocitos en un modelo de daño miocárdico por choque séptico en rata²⁷¹ y un modelo de daño por isquemia y reperfusión en ratón²⁷². Por el contrario, el miR-192-5p favorece la apoptosis en un modelo *in vitro* de daño por isquemia y reperfusión²⁷³. En cuanto al miR-4732-3p, se ha visto que este miARN tiene un efecto cardioprotector frente al daño por isquemia y reperfusión y, además, disminuye la fibrosis y promueve la angiogénesis²²⁹. Todos los miARNs estudiados, exceptuando el miR-4732-3p, muestran el mismo patrón de expresión, observando un incremento de su expresión después del tratamiento con doxorubicina solamente en los hiPSC-CM CTRL, observándose niveles significativamente superiores de estos miARNs en los hiPSC-CM CTRL tratados con doxorubicina comparados con los CTX. Por su parte, el miR-4732-3p está infraexpresado en los hiPSC-CM CTX respecto a los CTRL en condiciones basales, pero no después del tratamiento con doxorubicina. Esto concuerda con una mayor sensibilidad frente al daño de los hiPSC-CM CTX respecto a los CTRL inducida por niveles anormalmente bajos de este miARN cardioprotector. Puesto que la mayoría de estos miARNs tienen efectos cardioprotectores, las diferencias en su expresión entre los cardiomiocitos CTRL y CTX después del tratamiento con doxorubicina podrían estar relacionados con la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas y sería interesante estudiarlos con mayor profundidad en este contexto.

A lo largo de este trabajo se ha demostrado que los cardiomiocitos derivados de hiPSC obtenidas de pacientes oncológicos pediátricos que sufrieron cardiotoxicidad inducida por antraciclinas tienen una mayor susceptibilidad al daño inducido por doxorubicina *in vitro* comparados con cardiomiocitos de hiPSC control. Se ha visto que los hiPSC-CM CTX, después del tratamiento con doxorubicina, tienen una menor viabilidad,

mayores niveles de apoptosis, más estrés oxidativo, mayor daño genotóxico, mayor daño mitocondrial, y mayor desorganización sarcomérica, que los hiPSC-CM CTRL. Además, se han observado diferencias en la expresión de proteínas, ARNm y miARNs que podrían explicar, en parte, las diferencias relativas a la susceptibilidad frente al daño por doxorubicina entre las líneas de hiPSC-CM CTRL y CTX. Todo ello, convierte los hiPSC-CM CTX en un buen modelo para el estudio de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas, pudiendo emplearse para estudiar las bases moleculares de la enfermedad, así como para el cribado de fármacos y búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. No obstante, este trabajo tiene serias limitaciones que hay que tener en cuenta. En primer lugar, la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas en los pacientes de los cuales se derivaron las líneas de hiPSC es idiopática. Esto hace que no sea posible obtener controles isogénicos de las líneas de hiPSC-CM CTX, los cuáles serían el mejor control para comprender las diferencias en la susceptibilidad a la doxorubicina. Por este motivo, también sería necesario aumentar el número de líneas CTRL y CTX, ya que es bajo. No obstante, estas líneas fueron derivadas de pacientes pediátricos con cardiotoxicidad inducida por antraciclinas temprana, cuya incidencia es muy baja, motivo por el cuál es difícil aumentar el número de líneas de cardiomiocitos CTX. En segundo lugar, los cardiomiocitos obtenidos mediante el protocolo utilizado son inmaduros y podrían no reflejar fielmente el fenotipo de los cardiomiocitos maduros frente al daño por doxorubicina y las dosis de doxorubicina empleadas *in vitro* son superiores a la dosis que habría en el corazón durante el tratamiento en los pacientes. Por tanto, se podría intentar mejorar el modelo de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas *in vitro* mejorando la maduración de los cardiomiocitos y regulando las dosis de doxorubicina. Por último, los cardiomiocitos empleados son cardiomiocitos ventriculares fundamentalmente. Sería necesario el estudio de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas también en cardiomiocitos auriculares e incluso en otros tipos celulares cardíacos como fibroblastos o células endoteliales, ya que estos también pueden ser dañados por las antraciclinas. De hecho, se podrían generar microtejidos que incorporasen cardiomiocitos, fibroblastos y células endoteliales de las hiPSC de los pacientes para estudiar la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas en un modelo *in vitro* multicelular más similar al corazón.

2. Papel cardioprotector del miR-4732-3p frente al daño inducido por doxorubicina

Los miARNs juegan un papel fundamental en la enfermedad cardíaca, y se ha visto que pueden ser empleados como biomarcadores o como agentes terapéuticos. Por lo que respecta a la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas, no hay muchos biomarcadores que puedan predecir el desarrollo de una enfermedad cardíaca sintomática. En este estudio se investigó la relación entre miARNs identificados por miARNseq seguido de un análisis de regresión, y la disminución de la fracción de eyección ventricular izquierda medida por ecocardiografía. Empleando esta aproximación, hemos encontrado 25 miARNs relacionados con la cardiotoxicidad temprana posterior al tratamiento con antraciclinas, los cuales son potenciales biomarcadores o agentes terapéuticos para prevenir o tratar la cardiotoxicidad. Muchos de los miARNs detectados en este estudio han sido relacionados previamente con la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas. Por ejemplo, los miARNs de *Rattus norvegicus* rno-miR-26, rno-miR-30, rno-miR-146a y rno-miR-150, homólogos a los miARNs humanos, se encuentran desregulados después del tratamiento con doxorubicina en cardiomiocitos ventriculares de rata y en un modelo *in vivo* en rata de fallo cardíaco crónico inducido por antraciclinas²⁷⁴. Además, en una revisión sistemática, los miARNs miR-16-5p, miR-25-3p, miR-92a y miR-486 fueron asociados con la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas en pacientes con cáncer de mama²⁷⁵. Igualmente, el miR-486-3p y el miR-486-5p han mostrado una expresión diferencial después del tratamiento con doxorubicina que ocurre antes de la expresión de otros marcadores de citotoxicidad¹⁶⁹.

Nosotros nos hemos centrado en el miR-4732-3p, ya que es el miARN más desregulado entre los pacientes que experimentaron cardiotoxicidad inducida por antraciclinas en nuestro estudio, como muestran los tres modelos de regresión empleados. Mediante RT-qPCR se confirmó que este miARN se encuentra desregulado entre los casos y los controles. Aunque se sabe poco sobre este miARN, se sabe que está codificado dentro del locus del miR-144/451 y la reducción de los niveles de este miARN están relacionadas con una reducción de la supervivencia de las células eritroides y una menor eritropoyesis²³⁷. Además, el miR-4732-3p forma parte de una firma de miARN asociada al deterioro de la función cardíaca, indicando la posible relación de este miARN en procesos patológicos cardíacos²⁰⁰.

Para estudiar el efecto cardioprotector del miR-4732-3p frente al daño inducido por doxorubicina se emplearon células cardíacas neonatales de rata, las cuales fueron suministradas con un mimic sintético de este miARN y, después fueron tratadas con doxorubicina. La administración del mimic-4732 se realizó mediante transfección empleando lipofectamina, un reactivo que encapsula el mimic en liposomas y permite su captación por las células. Se pudo comprobar que las dosis testadas del mimic-4732 no tuvieron un efecto perjudicial sobre los cardiomiocitos neonatales de rata. Además, se estudió si la doxorubicina producía un aumento del miR-4732-3p *in vitro* en las células de rata, observándose que tanto en los cardiomiocitos como los fibroblastos cardíacos el tratamiento con doxorubicina produce un aumento de la expresión del este miARN. Esto contrasta con lo observado en los hiPSC-CM CTRL y CTX, ya que en estos no observamos que el tratamiento con doxorubicina alterara la expresión del miR-4732-3p. Esto podría ser debido a diferencias entre especies o al diferente grado de maduración de las células cardíacas.

La transfección del mimic-4732 previamente al tratamiento con doxorubicina tanto en los cardiomiocitos neonatales de rata (NRCM) como en los fibroblastos cardíacos de la misma especie (RCF) disminuyó la apoptosis, el estrés oxidativo y preservó la viabilidad celular. Además, en los cardiomiocitos se pudo observar que el tratamiento con el mimic-4732 aumentó la expresión de *Nfe2l2* y *Nrf1*. Ambos genes codifican para factores de transcripción encargados de inducir la expresión de proteínas antioxidantes^{249,276}, por lo que su regulación indirecta por parte del miR-4732-3p podría estar relacionada con su efecto cardioprotector.

Para comprender mejor la biología del miR-4732-3p y su relación con el corazón, decidimos estudiar su expresión en diferentes órganos de ratas Wistar de 30 días de edad. De todos los órganos estudiados, se pudo comprobar que la expresión del miR-4732-3p estaba aumentada en el corazón. Además, también se estudió la expresión del miR-4732-3p en corazón en ratas de diferentes edades. Observamos que la expresión de este miARN aumenta con la edad en el corazón.

También quisimos estudiar el efecto del miR-4732-3p frente al daño inducido por doxorubicina *in vivo*. Para ello, se emplearon ratas Wistar, las cuales fueron suministradas con doxorubicina de forma intraperitoneal (2 mg/kg) una vez por semana durante 6 semanas (dosis acumulada de 14 mg/kg) y, a las semanas 2 y 4, se administró el mimic-4732 (0,3 µg/kg) de forma intravenosa en una formulación liposomal. La función cardíaca de las ratas fue evaluada previamente al tratamiento con doxorubicina y a

las 7 semanas del comienzo de este. Comprobamos que la administración mimic-4732 redujo la pérdida de peso causada por la doxorubicina. Además, observamos que el mimic-4732 preservaba la función cardíaca de las ratas tratadas con doxorubicina, mejorando el cambio porcentual de área. Por otra parte, también se evaluó la expresión del miR-4732-3p después del tratamiento con doxorubicina, observándose una elevación de los niveles del miR-4732-3p después del tratamiento, lo que concuerda con lo observado en los cardiomiocitos neonatales de rata.

Después del tratamiento con doxorubicina, los animales se sacrificaron y los corazones fueron procesados para su análisis histológico. Observamos que el miR-4732-3p también es capaz de proteger el corazón del estrés oxidativo *in vivo*, como evidencia la tinción frente al 4-HNE, un producto de la peroxidación de lípidos que aumenta con el estrés oxidativo²⁷⁷, y la apoptosis, determinado mediante la técnica de TUNEL²⁷⁸. Además, el mimic-4732 disminuye la fibrosis y la acumulación de periostina en el tejido cardíaco. La periostina es una proteína cuya expresión aumenta durante el proceso fibrótico y es un marcador de miofibroblastos²⁷⁹, por lo que es posible que el miR-4732-3p prevenga la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. De hecho, la terapia anti-fibrótica dirigida a miofibroblastos ha sido propuesta como tratamiento para pacientes con fallo cardíaco avanzado²⁸⁰. Estos descubrimientos se ajustan a lo observado en el trabajo previo de nuestro grupo mostrando que el miR-4732-3p puede proteger el corazón frente al daño por hipoxia en un modelo de infarto de miocardio en rata, induciendo la angiogénesis y reduciendo el tamaño del infarto²²⁹. El hecho de que el miR-4732-3p pueda ejercer efectos cardioprotectores frente a dos tipos diferentes de daño miocárdico ponen de manifiesto su relación con los mecanismos de supervivencia y antioxidantes esenciales para la reparación del tejido cardíaco.

Para comprender mejor el mecanismo de acción del miR-4732-3p, decidimos explorar la regulación de Smad2, un componente de la vía de señalización de TGF- β , y YAP y p-YAP, como efectores principales de la vía de señalización de Hippo²³⁸⁻²⁴⁰, en células cardíacas humanas (fibroblastos cardíacos humanos y cardiomiocitos derivados de hiPSC). Se ha demostrado que el miR-4732-3p promueve la proliferación al inhibir la traducción de Smad2 y Smad4 en progenitores eritroides CD34+ humanos²³⁷. Nosotros observamos que la sobreexpresión de miR-4732-3p producía una disminución de los niveles de Smad2 en los hiPSC-CM. No obstante, en nuestras condiciones experimentales no observamos cambios en los niveles de Smad2 después de la sobreexpresión del miR-4732-3p en los HCF, lo que podría indicar un papel diferente de este

miARN en distintos tipos celulares. Por lo que respecta a YAP y p-YAP, los resultados presentados aquí son preliminares. Los miARNs actúan disminuyendo la traducción de sus ARNm diana. Nosotros observamos que el miR-4732-3p disminuye los niveles de p-YAP sin alterar los de YAP, por lo que pensamos que una de las quinasas aguas arriba en la vía de señalización de Hippo podría ser una diana del miR-4732-3p. El hecho de que el miR-4732-3p disminuya los niveles de p-YAP tanto en hiPSC-CM como HCF es interesante, ya que la reducción de la fosforilación podría evitar el secuestro citoplasmático de YAP, promoviendo su translocación al núcleo como factor transcripcional y la activación de la vía de Hippo²⁸¹. En este contexto, recientemente se ha descrito que los niveles de p-YAP se encuentran incrementados en cultivos de cardiomiocitos tratados con doxorubicina, pero el fármaco cardioprotector melatonina es capaz de disminuir sus niveles en comparación con cultivos no tratados. Además, los autores demostraron que los niveles de YAP contribuyen al efecto cardioprotector de la melatonina en la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina tanto *in vivo* como *in vitro* ya que un RNA de silenciamiento contra YAP elimina el efecto beneficioso de la melatonina²⁸².

Además, el hecho de que el miR-4732-3p tenga un efecto cardioprotector independientemente del tipo celular testado nos permite especular que el miR-4732-3p juega un papel pro-supervivencia no solo en el contexto de la cardiotoxicidad y el fallo cardíaco, sino también en otras condiciones de estrés. De hecho, este microARN ha sido el único desregulado después de vuelos espaciales en el cargamento de vesículas extracelulares pequeñas obtenidas del plasma de los astronautas y estudios *in silico* han correlacionado este miARN con procesos cardíacos y cerebrales²⁸³. Esto también concuerda con nuestro análisis funcional de genes diana predichos del miR-4732-3p, el cual incluye genes de las vías de señalización TGF- β , BMP y VEGF, las cuales ejercen funciones clave en procesos de supervivencia como la reparación cardíaca y la regeneración^{284,285}. En este contexto, el análisis *in silico* mostró una fuerte interacción con los miARNs miR-29b-3p, miR-125b-5p, miR-145-5p, y miR-155-5p. Aunque el análisis de interactoma no proporcionó vías específicas en las que estas moléculas estuvieran involucradas, estudios previos han mostrado su papel en procesos similares. Por ejemplo, el miR-29b-3p está regulado a la baja después del infarto de miocardio y su inhibición induce fibrosis cardíaca²¹³. La regulación a la baja del miR-29a-3p se asoció con la fibrosis pulmonar mediada por TGF- β y este miARN mostró un papel clave en la activación inducida por hipoxia de los fibroblastos pulmonares²⁸⁶. El miR-125-5p está involucrado en el control de la respuesta inflamatoria y la apoptosis celular

y está asociado con el accidente cerebrovascular^{287,288}. El miR-145-5p está regulado a la baja en pacientes con fallo cardíaco y ha sido relacionado con las vías de señalización de TGF- β y WNT²⁸⁹. Por otra parte, el miR-155-5p promueve la fibrosis intersticial y su inhibición mejora la función cardíaca en un modelo de infarto de miocardio en ratón²⁹⁰. Interesantemente, el miR-155-5p está regulado al alta en el daño cardíaco inducido por isoproterenol²⁹¹. Sin embargo, en nuestro conocimiento, no se ha encontrado relación entre estos microARN y la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas.

Se han descrito otros miARNs con efectos cardioprotectores frente al daño inducido por antraciclinas y por la isquemia similares al mostrado por el miR-4732-3p, pero ninguno ha sido probado frente ambos tipos de daño cardíaco. Por ejemplo, la sobreexpresión en corazón del miR-204 mediada por virus adeno-asociados en un modelo de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas ha mostrado tener un efecto cardioprotector vía la inhibición de HMGB1²⁹². En otro estudio se demostró que la administración de un mimic del miR-30e *in vitro* en cardiomiocitos tratados con doxorubicina disminuye la apoptosis al inhibir la expresión de la beclina-1²⁹³. Por otra parte, en el contexto de la cardioprotección frente al infarto de miocardio, se ha visto que la expresión del miR-19a/19b está aumentada en pacientes con fallo cardíaco, y la inyección intracardíaca de mimics sintéticos de estas moléculas tiene un efecto cardioprotector en ratones después del infarto de miocardio²⁹⁴.

Este estudio tiene varias limitaciones. En primer lugar, el número de casos en la cohorte principal y la cohorte de validación es bajo, por lo que hace falta verificar los datos en cohortes más grandes. En segundo lugar, las medidas de la función cardíaca mostraron una preservación del cambio porcentual de área en los animales tratados con doxorubicina en respuesta a la infusión de mimic-4732, pero no se observaron diferencias en la fracción de acortamiento. Esto sugiere que, aunque la preservación del tejido cardíaco queda patente en términos de reducción de la fibrosis y una perfusión mejorada, se requiere ajustar la dosis de mimic-4732 y una mejora de los métodos de administración para evitar la disfunción cardíaca. Finalmente, hemos empleado un modelo de cardiotoxicidad inducida por doxorubicina en ratas macho, mientras que la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas puede afectar tanto a pacientes varones como mujeres. La verificación del efecto cardioprotector del miR-4732-3p después del tratamiento con doxorubicina debería realizarse empleando también ratas hembra.

3. Efecto del miR-4732-3p sobre el daño inducido por doxorrubicina en cardiomiocitos derivados de hiPSC

Por último, quisimos comprobar, por una parte, si los hiPSC-CM CTX podían constituir un buen modelo para probar nuevos fármacos cardioprotectores, y por otra parte comprobar si el efecto cardioprotector del miR-4732-3p observado en los cardiomiocitos neonatales de rata también se replicaba en cardiomiocitos humanos derivados de iPSC. Observamos que la transfección empleando los mimics-NC y 4732, tanto en hiPSC-CM CTRL como CTX, tenía un efecto tóxico, disminuyendo la viabilidad de estos. En los hiPSC-CM CTRL la transfección con el mimic-4732 no mejoró la viabilidad de los cardiomiocitos tratados solamente con doxorrubicina, pero sí que mejoró significativamente la viabilidad de los cardiomiocitos transfectados con el mimic-NC y tratados con doxorrubicina. Esto podría deberse a que en ambos casos la transfección genera una toxicidad basal y, después del tratamiento con doxorrubicina, ese daño es todavía mayor. Por otra parte, esto no se observa en los cardiomiocitos de los pacientes. Esto podría deberse a que son más susceptibles al daño y la transfección les afecta más. Además, probamos un tratamiento con dexrazoxano, un fármaco que se sabe que es cardioprotector frente al daño por doxorrubicina, y tanto en los cardiomiocitos CTRL como en los CTX mejora la viabilidad de las células frente al daño por doxorrubicina.

Los datos de cardioprotección con el miR-4732-3p son preliminares y hay varios aspectos que pueden ser mejorados. En primer lugar, observamos un efecto tóxico de la transfección con los mimic que no habíamos observado en cardiomiocitos neonatales de rata. Esto podría deberse a que los hiPSC-CM son más susceptibles a la transfección que los NRCM. En la transfección se utilizó lipofectamina 3000. En un estudio llevado a cabo por Lessiza *et al.* se probaron diferentes formulaciones lipídicas comerciales para la transfección de cardiomiocitos, y se concluyó que la formulación más efectiva y menos tóxica es la Lipofectamina RNAiMAX²²². Por tanto, para reducir la toxicidad de la transfección del miR-4732-3p en hiPSC-CM se podrían emplear otras formulaciones lipídicas como la antes mencionada. Además, sería necesario ajustar bien la dosis de mimic, ya que se ha visto que la transfección de mimic de miARN a elevadas concentraciones puede producir una elevación de los niveles de miARN superiores a los fisiológicos, causando efectos adversos en las células que no están relacionados con sus genes diana²⁹⁵.

Por otra parte, los hiPSC-CM CTX tratados con dexrazoxano mejoran su viabilidad después del tratamiento con doxorubicina, indicando que estas células constituyen un buen modelo para el cribado de fármacos cardioprotectores frente al daño por doxorubicina. No obstante, sería necesario probar nuevos agentes tanto cardiotóxicos como cardioprotectores para validar el modelo.

Conclusiones

- Los hiPSC-CM de los pacientes que sufrieron cardiotoxicidad inducida por antraciclinas recapitulan la susceptibilidad al daño inducido por doxorubicina, en términos de viabilidad celular, apoptosis, estrés oxidativo, daño genómico, daño mitocondrial, y desorganización de los sarcómeros.
- La doxorubicina altera de forma diferencial la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, los sarcómeros, y la fibrosis en los hiPSC-CM de los pacientes y los hiPSC-CM CTRL.
- La doxorubicina altera de forma diferencial la expresión de miARNs con efectos cardioprotectores en los hiPSC-CM de los pacientes y los hiPSC-CM CTRL.
- Los hiPSC-CM de los pacientes pediátricos que experimentaron cardiotoxicidad constituyen un buen modelo para el estudio de los mecanismos de acción de la doxorubicina y el cribado de nuevos fármacos cardioprotectores.
- La sobreexpresión del miR-4732-3p tiene un efecto protector y antioxidante en células cardíacas de rata frente al daño inducido por doxorubicina.
- La administración del miR-4732-3p en ratas tratadas con doxorubicina previene el deterioro de la función cardíaca, disminuye el estrés oxidativo y la apoptosis en el corazón, disminuye la fibrosis cardíaca y favorece la vascularización.
- El miR-4732-3p regula, al menos en parte, las vías de señalización de Hippo y TGF- β .
- El miR-4732-3p podría utilizarse como una nueva herramienta terapéutica frente a la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas.

Bibliografía

1. Hulst MB, Grocholski T, Neefjes JJC, Wezel GP van, Metsä-Ketelä M. Anthracyclines: biosynthesis, engineering and clinical applications. *Nat Prod Rep* 2021;**39**:814–841.
2. Camerino B, Palamidessi G. Derivati della parazina II. Sulfonamidopir. *Gazz Chim Ital* 1960;**90**:1802–1815.
3. Marco A Di, Cassinelli G, Arcamone F. The discovery of daunorubicin. *Cancer Treat Rep* 1981;**65**:3–8.
4. Kabel A, Alghorabi AA, Kabel AM, Elmaaboud MAA, Doxorubicin ". Doxorubicin: insights into dynamics, clinical uses and adverse effects. *ResearchgateNet* 2019;**7**:17–20.
5. Tan C, Tasaka K, Yu KP, Murphy ML, Karnofsky DA. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* 1967;**20**:333–353.
6. Marco A Di, Gaetani M, Scarpinato B. Adriamycin (NSC-123,127): a new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother Rep* 1969;**53**:33–37.
7. Anthracyclines - StatPearls - NCBI Bookshelf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538187/> (8 November 2022)
8. Mancilla TR, Iskra B, Aune GJ. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Children. 2019;**9**:905–931.
9. Chow EJ, Leger KJ, Bhatt NS, Mulrooney DA, Ross CJ, Aggarwal S, Bansal N, Ehrhardt MJ, Armenian SH, Scott JM, Hong B. Paediatric cardio-oncology: Epidemiology, screening, prevention, and treatment. *Cardiovasc Res* 2019;**115**:922–934.
10. Bansal N, Blanco JG, Sharma UC, Pokharel S, Shisler S, Lipshultz SE. Cardiovascular diseases in survivors of childhood cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2020;**39**:55–68.
11. Tripaydonis A, Conyers R, Elliott DA. Pediatric Anthracycline- - Induced Cardiotoxicity : Mechanisms , Pharmacogenomics , and Pluripotent Stem-Cell Modeling. 2019;**105**.
12. Lipshultz SE, Adams MJ, Colan SD, Constine LS, Herman EH, Hsu DT, Hudson MM, Kremer LC, Landy DC, Miller TL, Oeffinger KC, Rosenthal DN, Sable CA,

- Sallan SE, Singh GK, Steinberger J, Cochran TR, Wilkinson JD. Long-term cardiovascular toxicity in children, adolescents, and young adults who receive cancer therapy: pathophysiology, course, monitoring, management, prevention, and research directions: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2013;**128**:1927–1955.
13. Leerink JM, Baat EC de, Feijen EAM, Bellersen L, Dalen EC van, Grotenhuis HB, Kapusta L, Kok WEM, Loonen J, Pal HJH van der, Pluijm SMF, Teske AJ, Mavinkurve-Groothuis AMC, Merx R, Kremer LCM. Cardiac Disease in Childhood Cancer Survivors: Risk Prediction, Prevention, and Surveillance: JACC CardioOncology State-of-the-Art Review. *JACC CardioOncology* 2020;**2**:363–378.
 14. Khouri MG, Douglas PS, Mackey JR, Martin M, Scott JM, Scherrer-Crosbie M, Jones LW. Cancer therapy-induced cardiac toxicity in early breast cancer: addressing the unresolved issues. *Circulation* 2012;**126**:2749–2763.
 15. Plana JC, Galderisi M, Barac A, Ewer MS, Ky B, Scherrer-Crosbie M, Ganame J, Sebag IA, Agler DA, Badano LP, Banchs J, Cardinale D, Carver J, Cerqueira M, DeCara JM, Edvardsen T, Flamm SD, Force T, Griffin BP, Jerusalem G, Liu JE, Magalhães A, Marwick T, Sanchez LY, Sicari R, Villarraga HR, Lancellotti P. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Hear journal Cardiovasc Imaging* 2014;**15**:1063–1093.
 16. Plana JC, Galderisi M, Barac A, Ewer MS, Ky B, Scherrer-Crosbie M, Ganame J, Sebag IA, Agler DA, Badano LP, Banchs J, Cardinale D, Carver J, Cerqueira M, Decara JM, Edvardsen T, Flamm SD, Force T, Griffin BP, Jerusalem G, Liu JE, Magalhães A, Marwick T, Sanchez LY, Sicari R, Villarraga HR, Lancellotti P. Expert consensus for multimodality imaging evaluation of adult patients during and after cancer therapy: a report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 2014;**27**:911–939.
 17. Nonaka M, Hosoda H, Uezono Y. Cancer treatment-related cardiovascular disease: Current status and future research priorities. *Biochem Pharmacol* 2021;**190**:114599.

18. Volkova M, Russell R. Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment. *Curr Cardiol Rev* 2012;**7**:214–220.
19. Linares Ballesteros A, Sanguino Lobo R, Villada Valencia JC, Arévalo Leal O, Plazas Hernández DC, Aponte Barrios N, Perdomo Ramírez I. Early-onset Cardiotoxicity assessment related to anthracycline in children with leukemia. A Prospective Study. *Colomb medica (Cali, Colomb* 2021;**52**:e2034542.
20. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology* 2010;**115**:155.
21. Alexandre J, Moslehi JJ, Bersell KR, Funck-Brentano C, Roden DM, Salem JE. Anticancer drug-induced cardiac rhythm disorders: Current knowledge and basic underlying mechanisms. *Pharmacol Ther* 2018;**189**:89–103.
22. Lipshultz SE, Miller TL, Scully RE, Lipsitz SR, Rifai N, Silverman LB, Colan SD, Neuberg DS, Dahlberg SE, Henkel JM, Asselin BL, Athale UH, Clavell LA, Laverdière C, Michon B, Schorin MA, Sallan SE. Changes in cardiac biomarkers during doxorubicin treatment of pediatric patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia: associations with long-term echocardiographic outcomes. *J Clin Oncol* 2012;**30**:1042–1049.
23. Getz KD, Sung L, Ky B, Gerbing RB, Leger KJ, Barz Leahy A, Sack L, Woods WG, Alonzo T, Gamis A, Aplenc R. Occurrence of Treatment-Related Cardiotoxicity and Its Impact on Outcomes Among Children Treated in the AAML0531 Clinical Trial: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2019;**37**:12–21.
24. Kremer LCM, Pal HJH van der, Offringa M, Dalen EC van, Voute PA. Frequency and risk factors of subclinical cardiotoxicity after anthracycline therapy in children: a systematic review. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2002;**13**:819–829.
25. Mulrooney DA, Yeazel MW, Kawashima T, Mertens AC, Mitby P, Stovall M, Donaldson SS, Green DM, Sklar CA, Robison LL, Leisenring WM. Cardiac outcomes in a cohort of adult survivors of childhood and adolescent cancer: retrospective analysis of the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *BMJ* 2009;**339**:34.
26. Jiji RS, Kramer CM, Salerno M. Non-invasive imaging and monitoring

- cardiotoxicity of cancer therapeutic drugs. *J Nucl Cardiol* 2012;**19**:377–388.
27. Bull SC, Main ML, Stevens GR, Goldman JH, Constable SA, Becher H. Cardiac toxicity screening by echocardiography in healthy volunteers: a study of the effects of diurnal variation and use of a core laboratory on the reproducibility of left ventricular function measurement. *Echocardiography* 2011;**28**:502–507.
 28. Čelutkienė J, Plymen CM, Flachskampf FA, Boer RA de, Grapsa J, Manka R, Anderson L, Garbi M, Barberis V, Filardi PP, Gargiulo P, Zamorano JL, Lainscak M, Seferovic P, Ruschitzka F, Rosano GMC, Nihoyannopoulos P. Innovative imaging methods in heart failure: a shifting paradigm in cardiac assessment. Position statement on behalf of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* 2018;**20**:1615–1633.
 29. Ville de Goyet M de, Brichard B, Robert A, Renard L, Veyckemans F, Vanhoutte L, Moniotte S. Prospective cardiac MRI for the analysis of biventricular function in children undergoing cancer treatments. *Pediatr Blood Cancer* 2015;**62**:867–874.
 30. Armstrong GT, Plana JC, Zhang N, Srivastava D, Green DM, Ness KK, Donovan FD, Metzger ML, Arevalo A, Durand JB, Joshi V, Hudson MM, Robison LL, Flamm SD. Screening adult survivors of childhood cancer for cardiomyopathy: comparison of echocardiography and cardiac magnetic resonance imaging. *J Clin Oncol* 2012;**30**:2876–2884.
 31. Čelutkienė J, Pudil R, López-Fernández T, Grapsa J, Nihoyannopoulos P, Bergler-Klein J, Cohen-Solal A, Farmakis D, Tocchetti CG, Haehling S von, Barberis V, Flachskampf FA, Čeponienė I, Haegler-Laube E, Suter T, Lapinskas T, Prasad S, Boer RA de, Wechalekar K, Anker MS, Iakobishvili Z, Bucciarelli-Ducci C, Schulz-Menger J, Cosyns B, Gaemperli O, Belenkov Y, Hulot JS, Galderisi M, Lancellotti P, Bax J, Marwick TH, Chioncel O, Jaarsma T, Mullens W, Piepoli M, Thum T, Heymans S, Mueller C, Moura B, Ruschitzka F, Zamorano JL, Rosano G, Coats AJS, Asteggiano R, Seferovic P, Edvardsen T, Lyon AR. Role of cardiovascular imaging in cancer patients receiving cardiotoxic therapies: a position statement on behalf of the Heart Failure Association (HFA), the European Association of Cardiovascular Imaging (EACVI) and the Cardio-Oncology Council of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail* 2020;**22**:1504–1524.

32. Lipshultz SE, Rifai N, Dalton VM, Levy DE, Silverman LB, Lipsitz SR, Colan SD, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Gelber RD, Sallan SE. The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;**351**:145–153.
33. Sherief LM, Kamal AG, Khalek EA, Kamal NM, Soliman AAA, Esh AM. Biomarkers and early detection of late onset anthracycline-induced cardiotoxicity in children. *Hematology* 2012;**17**:151–156.
34. M M, K N, Y S, Y O, K H, S S, G S, M J, H I. Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure. *N Engl J Med* 1990;**323**:757–758.
35. Aggarwal S, Pettersen MD, Bhambhani K, Gurczynski J, Thomas R, L'Ecuyer T. B-type natriuretic peptide as a marker for cardiac dysfunction in anthracycline-treated children. *Pediatr Blood Cancer* 2007;**49**:812–816.
36. Leger KJ, Leonard D, Nielson D, Lemos JA de, Mammen PPA, Winick NJ. Circulating microRNAs: Potential Markers of Cardiotoxicity in Children and Young Adults Treated With Anthracycline Chemotherapy. *J Am Heart Assoc* 2017;**6**.
37. Gioffré S, Chiesa M, Cardinale DM, Ricci V, Vavassori C, Cipolla CM, Masson S, Sandri MT, Salvatici M, Ciceri F, Latini R, Staszewsky LI, Pompilio G, Colombo GI, D'Alessandra Y. Circulating MicroRNAs as Potential Predictors of Anthracycline-Induced Troponin Elevation in Breast Cancer Patients: Diverging Effects of Doxorubicin and Epirubicin. *J Clin Med* 2020;**9**.
38. Aminkeng F, Bhavsar AP, Visscher H, Rassekh SR, Li Y, Lee JW, Brunham LR, Caron HN, Dalen EC Van, Kremer LC, Pal HJ Van Der, Amstutz U, Rieder MJ, Bernstein D, Carleton BC, Hayden MR, Ross CJD. A coding variant in RARG confers susceptibility to anthracycline-induced cardiotoxicity in childhood cancer. *Nat Genet* 2015;**47**:1079–1084.
39. Visscher H, Ross CJD, Rassekh SR, Sandor GSS, Caron HN, Dalen EC van, Kremer LC, Pal HJ van der, Rogers PC, Rieder MJ, Carleton BC, Hayden MR. Validation of variants in SLC28A3 and UGT1A6 as genetic markers predictive of anthracycline-induced cardiotoxicity in children. *Pediatr Blood Cancer* 2013;**60**:1375–1381.

40. Nebigil CG, Désaubry L. Updates in Anthracycline-Mediated Cardiotoxicity. 2018;**9**:1–13.
41. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev* 2020;**40**:158–189.
42. Xu MF, Tang PL, Qian ZM, Ashraf M. Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals. *Life Sci* 2001;**68**:889–901.
43. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátkai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L, Szabó C, Pacher P. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 2009;**296**:1466–1483.
44. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004;**4**:181–189.
45. Zhao Y, McLaughlin D, Robinson E, Harvey AP, Hookham MB, Shah AM, McDermott BJ, Grieve DJ. Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with Doxorubicin chemotherapy. *Cancer Res* 2010;**70**:9287–9297.
46. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and possible hydroxyl radical formation stimulated by the self-reduction of a doxorubicin-iron (III) complex. *Biochem Pharmacol* 1984;**33**:1725–1728.
47. Šimůnek T, Štěřba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Gerši V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* 2009;**61**:154–171.
48. Canzoneri JC, Oyelere AK. Interaction of anthracyclines with iron responsive element mRNAs. *Nucleic Acids Res* 2008;**36**:6825–6834.
49. Koleini N, Nickel BE, Edel AL, Fandrich RR, Ravandi A, Kardami E. Non-mitogenic FGF2 protects cardiomyocytes from acute doxorubicin-induced toxicity independently of the protein kinase CK2/heme oxygenase-1 pathway. *Cell Tissue Res* 2018;**374**:607–617.
50. Koleini N, Nickel BE, Edel AL, Fandrich RR, Ravandi A, Kardami E. Chemico-Biological Interactions Oxidized phospholipids in Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Chem Biol Interact* 2019;**303**:35–39.

51. Govender J, Loos B, Marais E, Engelbrecht AM. Mitochondrial catastrophe during doxorubicin-induced cardiotoxicity: A review of the protective role of melatonin. *J Pineal Res* 2014;**57**:367–380.
52. Carvalho RA, Sousa RPB, Cadete VJJ, Lopaschuk GD, Palmeira CMM, Bjork JA, Wallace KB. Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy. *Toxicology* 2010;**270**:92–98.
53. Catanzaro MP, Weiner A, Kaminaris A, Li C, Cai F, Zhao F, Kobayashi S, Kobayashi T, Huang Y, Sesaki H, Liang Q. Doxorubicin-induced cardiomyocyte death is mediated by unchecked mitochondrial fission and mitophagy. 2019:1–13.
54. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science (80-)* 1984;**226**:466–468.
55. Yi LL, Kerrigan JE, Lin CP, Azarova AM, Tsai YC, Ban Y, Liu LF. Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res* 2007;**67**:8839–8846.
56. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalife T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ETH. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* 2012;**18**:1639–1642.
57. Death C, Dikic I. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018.
58. Lekli I, Haines DD, Balla G, Tosaki A. Autophagy: an adaptive physiological countermeasure to cellular senescence and ischaemia/reperfusion-associated cardiac arrhythmias. *J Cell Mol Med* 2017;**21**:1058–1072.
59. Kobayashi S, Volden P, Timm D, Mao K, Xu X, Liang Q. Transcription factor GATA4 inhibits doxorubicin-induced autophagy and cardiomyocyte death. *J Biol Chem* 2010;**285**:793–804.
60. Li DL, Wang Z V, Ding G, Tan W, Luo X, Criollo A, Xie M, Jiang N, May H, Kyrychenko V, Schneider JW, Gillette TG, Hill JA. Doxorubicin Blocks Cardiomyocyte Autophagic Flux by Inhibiting Lysosome Acidification. 2016.
61. Sag CM, Köhler AC, Anderson ME, Backs J, Maier LS. CaMKII-dependent SR

- Ca leak contributes to doxorubicin-induced impaired Ca handling in isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**51**:749–759.
62. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis* 2007;**49**:330–352.
63. Christidi E, Brunham LR. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death Dis* 2021;**12**.
64. Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki KI, Murakoshi N, Iemitsu M, Miyauchi T, Yamaguchi I. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci* 2006;**101**:151–158.
65. Zhao L, Zhang B. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Sci Rep* 2017;**7**.
66. Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomed Pharmacother* 2021;**139**.
67. Cappetta D, Esposito G, Piegari E, Russo R, Ciuffreda LP, Rivellino A, Berrino L, Rossi F, Angelis A De, Urbanek K. SIRT1 activation attenuates diastolic dysfunction by reducing cardiac fibrosis in a model of anthracycline cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2016;**205**:99–110.
68. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev* 2014;**34**:106–135.
69. Zhan H, Aizawa K, Sun J, Tomida S, Otsu K, Conway SJ, McKinnon PJ, Manabe I, Komuro I, Miyagawa K, Nagai R, Suzuki T. Ataxia telangiectasia mutated in cardiac fibroblasts regulates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Res* 2016;**110**:85–95.
70. Goetzenich A, Hatam N, Zerneck A, Weber C, Czarnotta T, Autschbach R, Christiansen S. Alteration of matrix metalloproteinases in selective left ventricular adriamycin-induced cardiomyopathy in the pig. *J Heart Lung Transplant* 2009;**28**:1087–1093.

71. Spallarossa P, Altieri P, Garibaldi S, Ghigliotti G, Barisione C, Manca V, Fabbi P, Ballestrero A, Brunelli C, Barsotti A. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. *Cardiovasc Res* 2006;**69**:736–745.
72. Renu K, V.G. A, P.B. TP, Arunachalam S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update. *Eur J Pharmacol* 2018;**818**:241–253.
73. Allen TM, Martin FJ. Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. *Semin Oncol* 2004;**31**:5–15.
74. Li XR, Cheng XH, Zhang GN, Wang XX, Huang JM. Cardiac safety analysis of first-line chemotherapy drug pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2022;**15**.
75. Dalen EC van, Michiels EM, Caron HN, Kremer LC. Different anthracycline derivatives for reducing cardiotoxicity in cancer patients. *Cochrane database Syst Rev* 2010.
76. Vile GF, Winterbourn CC. No Tidl-N,N'-dicarboxamidomethyl-N,N'-dicarboxymethyl-1,2-diaminopropane (ICRF-198) and d-1,2-bis(3,5-dioxopiperazine-1-yl)propane (ICRF-187) inhibition of Fe³⁺ reduction, lipid peroxidation, and CaATPase inactivation in heart microsomes exposed to adriam. *Cancer Res* 1990;**50**:2307–2310.
77. Hasinoff BB, Herman EH. Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? *Cardiovasc Toxicol* 2007;**7**:140–144.
78. Martin E, Thougard AV, Grauslund M, Jensen PB, Bjorkling F, Hasinoff BB, Tjørnelund J, Sehested M, Jensen LH. Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology* 2009;**255**:72–79.
79. Dalen EC van, Caron HN, Dickinson HO, Kremer LCM. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;**2011**.
80. Reichardt P, Tabone MD, Mora J, Morland B, Jones RL. Risk-benefit of dexrazoxane for preventing anthracycline-related cardiotoxicity: re-evaluating the European labeling. *Future Oncol* 2018;**14**:2663–2676.

81. Baat EC de, Dalen EC van, Mulder RL, Hudson MM, Ehrhardt MJ, Engels FK, Feijen EAM, Grotenhuis HB, Leerink JM, Kapusta L, Kaspers GJL, Merkx R, Mertens L, Skinner R, Tissing WJE, Vathaire F de, Nathan PC, Kremer LCM, Mavinkurve-Groothuis AMC, Armenian S. Primary cardioprotection with dexrazoxane in patients with childhood cancer who are expected to receive anthracyclines: recommendations from the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group. *Lancet Child Adolesc Heal* 2022.
82. Nitiss KC, Nitiss JL. Twisting and ironing: doxorubicin cardiotoxicity by mitochondrial DNA damage. *Clin Cancer Res* 2014;**20**:4737–4739.
83. Lin SC, Talbot P. Stem Cells. *Encycl Toxicol Third Ed* 2014:390–394.
84. Loya K. Stem Cells. *Handb Pharmacogenomics Stratif Med* 2014:207–231.
85. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkowicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol* 2015;**62**:329–337.
86. Briggs R, King TJ. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1952;**38**:455–463.
87. King TJ, Briggs R. CHANGES IN THE NUCLEI OF DIFFERENTIATING GASTRULA CELLS, AS DEMONSTRATED BY NUCLEAR TRANSPLANTATION. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1955;**41**:321–325.
88. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;**385**:810–813.
89. Stevens LC, Little CC. Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1954;**40**:1080–1087.
90. Kleinsmith LJ, Pierce GB. MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. *Cancer Res* 1964;**24**:1544–1551.
91. Kahan BW, Ephrussi B. Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratomaitle. *J Natl Cancer Inst* 1970;**44**:1015–1036.
92. Miller RA, Ruddle FH. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell* 1976;**9**:45–55.
93. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from

- mouse embryos. *Nature* 1981;**292**:154–156.
94. JA T, J I-E, SS S, MA W, JJ S, VS M, JM J. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;**282**:1145–1147.
95. King NMP, Perrin J. Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem Cell Res Ther* 2014;**5**.
96. Arendt D, Musser JM, Baker CVH, Bergman A, Cepko C, Erwin DH, Pavlicev M, Schlosser G, Widder S, Laubichler MD, Wagner GP. The origin and evolution of cell types. *Nat Rev Genet* 2016;**17**:744–757.
97. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987;**51**:987–1000.
98. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010;**142**:375–386.
99. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010;**463**:1035–1041.
100. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;**126**:663–676.
101. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. 2007:861–872.
102. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;**448**:313–317.
103. Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol* 2008;**18**:890–894.
104. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE, Jaenisch R, Lander ES, Meissner A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 2008;**454**:49–55.
105. Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, Jaenisch

- R. Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells. *Cell Stem Cell* 2008;**2**:151–159.
106. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008;**322**:949–953.
107. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009;**85**:348–362.
108. Nakanishi M, Otsu M. Development of Sendai virus vectors and their potential applications in gene therapy and regenerative medicine. *Curr Gene Ther* 2012;**12**:410–416.
109. Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, Panetta NJ, Chen ZY, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 2010;**7**:197–199.
110. Narsinh KH, Jia F, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat Protoc* 2011;**6**:78–88.
111. Belviso I, Romano V, Nurzynska D, Castaldo C, Meglio F Di, Belviso I, Romano V, Nurzynska D, Castaldo C, Meglio F Di. Non-integrating Methods to Produce Induced Pluripotent Stem Cells for Regenerative Medicine: An Overview. *Biomech Funct Tissue Eng* 2020.
112. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010;**7**:618–630.
113. Plews JR, Li JL, Jones M, Moore HD, Mason C, Andrews PW, Na J. Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach. *PLoS One* 2010;**5**.
114. Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, Nishikawa S,

- Tanemura M, Mimori K, Tanaka F, Saito T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 2011;**8**:633–638.
115. Kim D, Kim CH, Moon J II, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009;**4**:472–476.
116. Guan J, Wang G, Wang J, Zhang Z, Fu Y, Cheng L, Meng G, Lyu Y, Zhu J, Li Y, Wang Y, Liuyang S, Liu B, Yang Z, He H, Zhong X, Chen Q, Zhang X, Sun S, Lai W, Shi Y, Liu L, Wang L, Li C, Lu S, Deng H. Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. *Nature* 2022;**605**:325–331.
117. Lin T, Wu S. Reprogramming with small molecules instead of exogenous transcription factors. *Stem Cells Int* 2015;**2015**.
118. Karagiannis P, Takahashi K, Saito M, Yoshida Y, Okita K, Watanabe A, Inoue H, Yamashita JK, Todani M, Nakagawa M, Osawa M, Yashiro Y, Yamanaka S, Osafune K. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol Rev* 2019;**99**:79–114.
119. Rowe RG, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Genet* 2019;**20**:377.
120. Yamanaka S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* 2020;**27**:523–531.
121. Mandai M, Kurimoto Y, Takahashi M. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* 2017;**377**:792–793.
122. Turner M, Leslie S, Martin NG, Peschanski M, Rao M, Taylor CJ, Trounson A, Turner D, Yamanaka S, Wilmut I. Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library. *Cell Stem Cell* 2013;**13**:382–384.
123. Onakpoya IJ, Heneghan CJ, Aronson JK. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. *BMC Med* 2016;**14**.
124. Sharma A, Burridge PW, McKeithan WL, Serrano R, Shukla P, Sayed N, Churko JM, Kitani T, Wu H, Holmström A, Matsa E, Zhang Y, Kumar A, Fan AC, Álamo

- JC Del, Wu SM, Moslehi JJ, Mercola M, Wu JC. High-throughput screening of tyrosine kinase inhibitor cardiotoxicity with human induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* 2017;**9**.
125. Force T, Krause DS, Etten RA Van. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat Rev Cancer* 2007;**7**:332–344.
126. Ware BR, Berger DR, Khetani SR. Prediction of Drug-Induced Liver Injury in Micropatterned Co-cultures Containing iPSC-Derived Human Hepatocytes. *Toxicol Sci* 2015;**145**:252–262.
127. Okano H, Morimoto S. iPSC-based disease modeling and drug discovery in cardinal neurodegenerative disorders. *Cell Stem Cell* 2022;**29**:189–208.
128. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, Shaw PJ, Simmons Z, Berg LH Van Den. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Prim* 2017;**3**.
129. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008;**321**:1218–1221.
130. Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, Dion PA, Bercier V, Bourgouin P, Rochefort D, Bel Hadj S, Durham HD, Velde C Vande, Rouleau GA, Drapeau P. Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. *Hum Mol Genet* 2010;**19**:671–683.
131. Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MCN, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* 2012;**4**.
132. Chen H, Qian K, Du Z, Cao J, Petersen A, Liu H, Blackburn LW, Huang CL, Errigo A, Yin Y, Lu J, Ayala M, Zhang SC. Modeling ALS with iPSCs reveals that mutant SOD1 misregulates neurofilament balance in motor neurons. *Cell Stem Cell* 2014;**14**:796–809.

133. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, Nixon RA, Jones DT. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Prim* 2021;**7**.
134. Israel MA, Yuan SH, Bardy C, Reyna SM, Mu Y, Herrera C, Hefferan MP, Gorp S Van, Nazor KL, Boscolo FS, Carson CT, Laurent LC, Marsala M, Gage FH, Remes AM, Koo EH, Goldstein LSB. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 2012;**482**:216–220.
135. Mungenast AE, Siegert S, Tsai LH. Modeling Alzheimer's disease with human induced pluripotent stem (iPS) cells. *Mol Cell Neurosci* 2016;**73**:13–31.
136. Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. *Eur J Neurol* 2020;**27**:27–42.
137. Ambasudhan R, Ryan SD, Dolatabadi N, Chan SF, Zhang X, Akhtar MW, Parker J, Soldner F, Sunico CR, Nagar S, Talantova M, Lee B, Lopez K, Nutter A, Shan B, Molokanova E, Zhang Y, Han X, Nakamura T, Masliah E, Yates JR, Nakanishi N, Andreyev AY, Okamoto SI, Jaenisch R, Lipton SA. Isogenic human iPSC Parkinson's model shows nitrosative stress-induced dysfunction in MEF2-PGC1 α transcription. *Cell* 2013;**155**:1351.
138. Jiang H, Ren Y, Yuen EY, Zhong P, Ghaedi M, Hu Z, Azabdaftari G, Nakaso K, Yan Z, Feng J. Parkin controls dopamine utilization in human midbrain dopaminergic neurons derived from induced pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2012;**3**.
139. Rashid ST, Corbiveau S, Hannan N, Marciniak SJ, Miranda E, Alexander G, Huang-Doran I, Griffin J, Ahrlund-Richter L, Skepper J, Semple R, Weber A, Lomas DA, Vallier L. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2010;**120**:3127–3136.
140. Maetzel D, Sarkar S, Wang H, Abi-Mosleh L, Xu P, Cheng AW, Gao Q, Mitalipova M, Jaenisch R. Genetic and chemical correction of cholesterol accumulation and impaired autophagy in hepatic and neural cells derived from Niemann-Pick Type C patient-specific iPSC cells. *Stem cell reports* 2014;**2**:866–880.
141. Kim Y, Choi JY, Lee SH, Lee BH, Yoo HW, Han YM. Malfunction in Mitochondrial β -Oxidation Contributes to Lipid Accumulation in Hepatocyte-Like Cells Derived from Citrin Deficiency-Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev* 2016;**25**:636–647.

142. Protze SI, Lee JH, Keller GM. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiovascular Cells: From Developmental Biology to Therapeutic Applications. *Cell Stem Cell* 2019;**25**:311–327.
143. Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flügel L, Dorn T, Goedel A, Höhnke C, Hofmann F, Seyfarth M, Sinnecker D, Schömig A, Laugwitz K-L. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2010;**363**:1397–1409.
144. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A, Feldman O, Gepstein A, Arbel G, Hammerman H, Boulos M, Gepstein L. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;**471**:225–230.
145. Penttinen K, Swan H, Vanninen S, Paavola J, Lahtinen AM, Kontula K, Aalto-Setälä K. Antiarrhythmic Effects of Dantrolene in Patients with Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia and Replication of the Responses Using iPSC Models. *PLoS One* 2015;**10**.
146. Kim C, Wong J, Wen J, Wang S, Wang C, Spiering S, Kan NG, Forcales S, Puri PL, Leone TC, Marine JE, Calkins H, Kelly DP, Judge DP, Chen HSV. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature* 2013;**494**:105–110.
147. Sun N, Yazawa M, Liu J, Han L, Sanchez-Freire V, Abilez OJ, Navarrete EG, Hu S, Wang L, Lee A, Pavlovic A, Lin S, Chen R, Hajjar RJ, Snyder MP, Dolmetsch RE, Butte MJ, Ashley EA, Longaker MT, Robbins RC, Wu JC. Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med* 2012;**4**.
148. Smith JGW, Owen T, Bhagwan JR, Mosqueira D, Scott E, Mannhardt I, Patel A, Barriales-Villa R, Monserrat L, Hansen A, Eschenhagen T, Harding SE, Marston S, Denning C. Isogenic Pairs of hiPSC-CMs with Hypertrophic Cardiomyopathy/LVNC-Associated ACTC1 E99K Mutation Unveil Differential Functional Deficits. *Stem cell reports* 2018;**11**:1226–1243.
149. Lan F, Lee AS, Liang P, Sanchez-Freire V, Nguyen PK, Wang L, Han L, Yen M, Wang Y, Sun N, Abilez OJ, Hu S, Ebert AD, Navarrete EG, Simmons CS, Wheeler M, Pruitt B, Lewis R, Yamaguchi Y, Ashley EA, Bers DM, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. Abnormal calcium handling properties underlie familial

- hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2013;**12**:101–113.
150. Redd MA, Scheuer SE, Saez NJ, Yoshikawa Y, Chiu HS, Gao L, Hicks M, Villanueva JE, Joshi Y, Chow CY, Cuellar-Partida G, Peart JN, See Hoe LE, Chen X, Sun Y, Suen JY, Hatch RJ, Rollo B, Xia D, Alzubaidi MAH, Maljevic S, Quaife-Ryan GA, Hudson JE, Porrello ER, White MY, Cordwell SJ, Fraser JF, Petrou S, Reichelt ME, Thomas WG, King GF, Macdonald PS, Palpant NJ. Therapeutic Inhibition of Acid-Sensing Ion Channel 1a Recovers Heart Function After Ischemia-Reperfusion Injury. *Circulation* 2021;**144**:947–960.
 151. Ontoria-Oviedo I, Földes G, Tejedor S, Panadero J, Kitani T, Vázquez A, Wu JC, Harding SE, Sepúlveda P. Modeling Transposition of the Great Arteries with Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci* 2021;**22**.
 152. Davis RP, Casini S, Berg CW Van Den, Hoekstra M, Remme CA, Dambrot C, Salvatori D, Oostwaard DW Van, Wilde AAM, Bezzina CR, Verkerk AO, Freund C, Mummery CL. Cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells recapitulate electrophysiological characteristics of an overlap syndrome of cardiac sodium channel disease. *Circulation* 2012;**125**:3079–3091.
 153. Sala L, Yu Z, Ward-van Oostwaard D, Veldhoven JP, Moretti A, Laugwitz K, Mummery CL, IJzerman AP, Bellin M. A new hERG allosteric modulator rescues genetic and drug-induced long-QT syndrome phenotypes in cardiomyocytes from isogenic pairs of patient induced pluripotent stem cells. *EMBO Mol Med* 2016;**8**:1065–1081.
 154. Hinson JT, Chopra A, Nafissi N, Polacheck WJ, Benson CC, Swist S, Gorham J, Yang L, Schafer S, Sheng CC, Haghghi A, Homasy J, Hubner N, Church G, Cook SA, Linke WA, Chen CS, Seidman JG, Seidman CE. HEART DISEASE. Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science* 2015;**349**:982–986.
 155. Maron BJ, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet (London, England)* 2013;**381**:242–255.
 156. Han L, Li Y, Tchao J, Kaplan AD, Lin B, Li Y, Mich-Basso J, Lis A, Hassan N, London B, Bett GCL, Tobita K, Rasmusson RL, Yang L. Study familial hypertrophic cardiomyopathy using patient-specific induced pluripotent stem

- cells. *Cardiovasc Res* 2014;**104**:258–269.
157. Moroni F, Gertz Z, Azzalini L. Relief of Ischemia in Ischemic Cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep* 2021;**23**.
158. Barbuti A, Benzoni P, Campostrini G, Dell’Era P. Human derived cardiomyocytes: A decade of knowledge after the discovery of induced pluripotent stem cells. *Dev Dyn* 2016;**245**:1145–1158.
159. Shinozawa T, Imahashi K, Sawada H, Furukawa H, Takami K. Determination of appropriate stage of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug screening and pharmacological evaluation in vitro. *J Biomol Screen* 2012;**17**:1192–1203.
160. Andrysiak K, Stępniewski J, Dulak J. Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, 3D cardiac structures, and heart-on-a-chip as tools for drug research. *Pflugers Arch* 2021;**473**:1061–1085.
161. Kane C, Terracciano CMN. Concise Review: Criteria for Chamber-Specific Categorization of Human Cardiac Myocytes Derived from Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 2017;**35**:1881–1897.
162. Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res* 2016;**118**:1021–1040.
163. Giacomelli E, Meraviglia V, Campostrini G, Cochrane A, Cao X, Helden RWJ van, Krotenberg Garcia A, Mircea M, Kostidis S, Davis RP, Meer BJ van, Jost CR, Koster AJ, Mei H, Míguez DG, Mulder AA, Ledesma-Terrón M, Pompilio G, Sala L, Salvatori DCF, Sliker RC, Sommariva E, Vries AAF de, Giera M, Semrau S, Tertoolen LGJ, Orlova V V., Bellin M, Mummery CL. Human-iPSC-Derived Cardiac Stromal Cells Enhance Maturation in 3D Cardiac Microtissues and Reveal Non-cardiomyocyte Contributions to Heart Disease. *Cell Stem Cell* 2020;**26**:862-879.e11.
164. Campostrini G, Meraviglia V, Giacomelli E, Helden RWJ van, Yiangou L, Davis RP, Bellin M, Orlova V V., Mummery CL. Generation, functional analysis and applications of isogenic three-dimensional self-aggregating cardiac microtissues from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2021;**16**:2213–2256.
165. Hnatiuk AP, Briganti F, Staudt DW, Mercola M. Human iPSC modeling of heart

- disease for drug development. *Cell Chem Biol* 2021;**28**:271–282.
166. Adamcova M, Skarkova V, Seifertova J, Rudolf E. Cardiac Troponins are Among Targets of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in hiPCS-CMs. 2019.
167. Holmgren G, Synnergren J, Bogestål Y, Améen C, Åkesson K, Holmgren S, Lindahl A, Sartipy P. Identification of novel biomarkers for doxorubicin-induced toxicity in human cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells. *Toxicology* 2015;**328**:102–111.
168. Chaudhari U, Nemade H, Wagh V, Gaspar JA, Ellis JK, Srinivasan SP, Spitkovski D, Nguemo F, Louisse J, Bremer S, Hescheler J, Keun HC, Hengstler JG, Sachinidis A. Identification of genomic biomarkers for anthracycline-induced cardiotoxicity in human iPSC-derived cardiomyocytes: an in vitro repeated exposure toxicity approach for safety assessment. *Arch Toxicol* 2016;**90**:2763–2777.
169. Toxicol A, Chaudhari U, Nemade H, Antonydas J, Hescheler J, Hengstler JG, Sachinidis A. MicroRNAs as early toxicity signatures of doxorubicin in human - induced pluripotent stem cell - derived cardiomyocytes. *Arch Toxicol* 2016.
170. Holmgren G, Synnergren J, Andersson CX, Lindahl A, Sartipy P. MicroRNAs as potential biomarkers for doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Vitro* 2016;**34**:26–34.
171. Holmgren G, Sartipy P, Andersson CX, Synnergren J. Expression Profiling of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Exposed to Doxorubicin — Integration and Visualization of Multi-Omics Data. 2018;**163**:182–195.
172. Chaudhari U, Ellis JK, Wagh V, Nemade H, Hescheler J, Keun HC, Sachinidis A. Metabolite signatures of doxorubicin induced toxicity in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Amino Acids* 2017;**49**:1955–1963.
173. Jay SM, Murthy AC, Hawkins JF, Wortzel JR, Steinhauser ML, Alvarez LM, Gannon J, Macrae CA, Griffith LG, Lee RT. An engineered bivalent neuregulin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity with reduced proneoplastic potential. *Circulation* 2013;**128**:152–161.
174. Chatterjee S, Hofer T, Costa A, Lu D, Batkai S, Gupta SK, Bolesani E, Zweigerdt R, Megias D, Streckfuss-Bömeke K, Brandenberger C, Thum T, Bär C.

- Telomerase therapy attenuates cardiotoxic effects of doxorubicin. *Mol Ther* 2021;**29**:1395–1410.
175. Reynolds JG, Geretti E, Hendriks BS, Lee H, Leonard SC, Klinz SG, Noble CO, Lücker PB, Zandstra PW, Drummond DC, Olivier KJ, Nielsen UB, Niyikiza C, Agresta S V., Wickham TJ. HER2-targeted liposomal doxorubicin displays enhanced anti-tumorigenic effects without associated cardiotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;**262**:1–10.
176. Kuruvilla SP, Tiruchinapally G, Crouch AC, EISayed MEH, Greve JM. Dendrimer-doxorubicin conjugates exhibit improved anticancer activity and reduce doxorubicin-induced cardiotoxicity in a murine hepatocellular carcinoma model. *PLoS One* 2017;**12**:1–24.
177. Burridge PW, Li YF, Matsa E, Wu H, Ong SG, Sharma A, Holmström A, Chang AC, Coronado MJ, Ebert AD, Knowles JW, Telli ML, Witteles RM, Blau HM, Bernstein D, Altman RB, Wu JC. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* 2016;**22**:547–556.
178. Kitani T, Ong SG, Lam CK, Rhee JW, Zhang JZ, Oikonomopoulos A, Ma N, Tian L, Lee J, Telli ML, Witteles RM, Sharma A, Sayed N, Wu JC. Human-Induced Pluripotent Stem Cell Model of Trastuzumab-Induced Cardiac Dysfunction in Patients With Breast Cancer. *Circulation* 2019;**139**:2451–2465.
179. Christidi E, Huang H, Shafaattalab S, Maillet A, Lin E, Huang K, Laksman Z, Davis MK, Tibbits GF, Brunham LR. Variation in RARG increases susceptibility to doxorubicin-induced cardiotoxicity in patient specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Sci Rep* 2020;**10**:1–13.
180. Magdy T, Jouni M, Kuo HH, Weddle CJ, Lyra-Leite D, Fonoudi H, Romero-Tejeda M, Gharib M, Javed H, Fajardo G, Ross CJD, Carleton BC, Bernstein D, Burridge PW. Identification of Drug Transporter Genomic Variants and Inhibitors That Protect Against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Circulation* 2022;**145**:279–294.
181. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 2018;**173**:20–51.
182. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*

- 1993;**75**:843–854.
183. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000;**403**:901–906.
184. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000;**408**:86–89.
185. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;**294**:853–858.
186. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001;**294**:862–864.
187. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001;**294**:858–862.
188. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;**19**:92–105.
189. Shabalina SA, Koonin E V. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol* 2008;**23**:578–587.
190. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004;**116**:281–297.
191. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol* 2019;**234**:5451–5465.
192. Nguyen TA, Jo MH, Choi YG, Park J, Kwon SC, Hohng S, Kim VN, Woo JS. Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* 2015;**161**:1374–1387.
193. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004;**303**:95–98.
194. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*

- 2014;**15**:509–524.
195. Abdelfattah AM, Park C, Choi MY. Update on non-canonical microRNAs. *Biomol Concepts* 2014;**5**:275–287.
196. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Lee SS. Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update. *J Adv Res* 2020;**28**:127–138.
197. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:10513–10518.
198. Wu Y, Li Q, Zhang R, Dai X, Chen W, Xing D. Circulating microRNAs: Biomarkers of disease. *Clin Chim Acta* 2021;**516**:46–54.
199. Ovchinnikova ES, Schmitter D, Vegter EL, Maaten JM Ter, Valente MAE, Liu LCY, Harst P Van Der, Pinto YM, Boer RA De, Meyer S, Teerlink JR, O'Connor CM, Metra M, Davison BA, Bloomfield DM, Cotter G, Cleland JG, Mebazaa A, Laribi S, Givertz MM, Ponikowski P, Meer P Van Der, Veldhuisen DJ Van, Voors AA, Berezikov E. Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail* 2016;**18**:414–423.
200. Su Y, Sun Y, Tang Y, Li H, Wang X, Pan X, Liu W, Zhang X, Zhang F, Xu Y, Yan C, Ong SB, Xu D. Circulating mir-19b-3p as a novel prognostic biomarker for acute heart failure. *J Am Heart Assoc* 2021;**10**.
201. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, Kempf T, Wollert KC, Thum T. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**51**:872–875.
202. Karakas M, Schulte C, Appelbaum S, Ojeda F, Lackner KJ, Münzel T, Schnabel RB, Blankenberg S, Zeller T. Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease-results from the large AtheroGene study. *Eur Heart J* 2017;**38**:516–523.
203. Bye A, Røsjø H, Nauman J, Silva GJJ, Follestad T, Omland T, Wisløff U. Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals - The HUNT study. *J Mol Cell Cardiol* 2016;**97**:162–168.

204. Safa A, Bahroudi Z, Shoorei H, Majidpoor J, Abak A, Taheri M, Ghafouri-Fard S. miR-1: A comprehensive review of its role in normal development and diverse disorders. *Biomed Pharmacother* 2020;**132**.
205. Oliveira-Carvalho Rigaud V, Ferreira LR, Ayub-Ferreira SM, Ávila MS, Brandão SM, Cruz FD, Santos MH, BBV Cruz C, Alves MS, Issa VS, Guimarães G V, Cunha-Neto E, Bocchi EA. Circulating miR-1 as a potential biomarker of doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. 2016.
206. Vegter EL, Meer P Van Der, Windt LJ De, Pinto YM, Voors AA. MicroRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy. *Eur J Heart Fail* 2016;**18**:457–468.
207. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2007;**100**:416–424.
208. Elia L, Contu R, Quintavalle M, Varrone F, Chimenti C, Russo MA, Cimino V, Marinis L De, Frustaci A, Catalucci D, Condorelli G. Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. *Circulation* 2009;**120**:2377–2385.
209. Ikeda S, He A, Kong SW, Lu J, Bejar R, Bodyak N, Lee K-H, Ma Q, Kang PM, Golub TR, Pu WT. MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. *Mol Cell Biol* 2009;**29**:2193–2204.
210. Karakikes I, Chaanine AH, Kang S, Mukete BN, Jeong D, Zhang S, Hajjar RJ, Lebeche D. Therapeutic cardiac-targeted delivery of miR-1 reverses pressure overload-induced cardiac hypertrophy and attenuates pathological remodeling. *J Am Heart Assoc* 2013;**2**.
211. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006;**38**:228–233.
212. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MVG, Høydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW, Ellingsen Ø, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*

- 2007;**13**:613–618.
213. Rooij E Van, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:13027–13032.
214. Zhang Y, Huang XR, Wei LH, Chung AC, Yu CM, Lan HY. miR-29b as a therapeutic agent for angiotensin II-induced cardiac fibrosis by targeting TGF- β /Smad3 signaling. *Mol Ther* 2014;**22**:974–985.
215. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JTR, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008;**456**:980–984.
216. Roy S, Khanna S, Hussain SRA, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ, Sen CK. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res* 2009;**82**:21–29.
217. Sedmera D, Reckova M, DeAlmeida A, Coppin SR, Kubalak SW, Gourdie RG, Thompson RP. Spatiotemporal pattern of commitment to slowed proliferation in the embryonic mouse heart indicates progressive differentiation of the cardiac conduction system. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003;**274**:773–777.
218. Ye L, D'Agostino G, Loo SJ, Wang CX, Su LP, Tan SH, Tee GZ, Pua CJ, Pena EM, Cheng RB, Chen WC, Abdurrachim D, Lalic J, Tan RS, Lee TH, Zhang JY, Cook SA. Early Regenerative Capacity in the Porcine Heart. *Circulation* 2018;**138**:2798–2808.
219. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 2010;**72**:19–44.
220. Eulalio A, Mano M, Ferro MD, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, Giacca M. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* 2012;**492**:376–381.

221. Gabisonia K, Prosdocimo G, Aquaro GD, Carlucci L, Zentilin L, Secco I, Ali H, Braga L, Gorgodze N, Bernini F, Burchielli S, Collesi C, Zandonà L, Sinagra G, Piacenti M, Zacchigna S, Bussani R, Recchia FA, Giacca M. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs. *Nature* 2019;**569**:418–422.
222. Lesizza P, Prosdocimo G, Martinelli V, Sinagra G, Zacchigna S, Giacca M. Single-Dose Intracardiac Injection of Pro-Regenerative MicroRNAs Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction. *Circ Res* 2017;**120**:1298–1304.
223. Chen L, Xu Y. MicroRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: A Review. *Front Cardiovasc Med* 2021;**8**.
224. Gupta SK, Garg A, Avramopoulos P, Engelhardt S, Streckfuss-bömeke K, Batkai S, Thum T. miR-212 / 132 Cluster Modulation Prevents Doxorubicin-Mediated Atrophy and Cardiotoxicity. *Mol Ther* 2019;**27**:17–28.
225. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013;**53**:401–426.
226. Hu X, Liu H, Wang Z, Hu Z, Li L. miR-200a Attenuated Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity through Upregulation of Nrf2 in Mice. *Oxid Med Cell Longev* 2019;**2019**.
227. Zhao L, Qi Y, Xu L, Tao X, Han X, Yin L, Peng J. MicroRNA-140-5p aggravates doxorubicin-induced cardiotoxicity by promoting myocardial oxidative stress via targeting Nrf2 and Sirt2. *Redox Biol* 2018;**15**:284–296.
228. Han D, Wang Y, Wang Y, Dai X, Zhou T, Chen J, Tao B, Zhang J, Cao F. The Tumor-Suppressive Human Circular RNA CircITCH Sponges miR-330-5p to Ameliorate Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity through Upregulating SIRT6, Survivin, and SERCA2a. *Circ Res* 2020;**127**:E108–E125.
229. Sánchez-Sánchez R, Gómez-Ferrer M, Reinal I, Buigues M, Villanueva-Bádenas E, Ontoria-Oviedo I, Hernández A, González-King H, Peiró-Molina E, Dorronsoro A, Sepúlveda P. miR-4732-3p in Extracellular Vesicles From Mesenchymal Stromal Cells Is Cardioprotective During Myocardial Ischemia. *Front cell Dev Biol* 2021;**9**:734143.
230. Kleinsorge M, Cyganek L. Subtype-Directed Differentiation of Human iPSCs into

- Atrial and Ventricular Cardiomyocytes. *STAR Protoc* 2020;**1**:100026.
231. Armiñán A, Gandía C, García-Verdugo JM, Lledó E, Mullor JL, Montero JA, Sepúlveda P. Cardiac transcription factors driven lineage-specification of adult stem cells. *J Cardiovasc Transl Res* 2010;**3**:61–65.
232. Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation* 1994;**89**:345–354.
233. Sticht C, La Torre C De, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS One* 2018;**13**.
234. Tokar T, Pastrello C, Rossos AEM, Abovsky M, Hauschild AC, Tsay M, Lu R, Jurisica I. mirDIP 4.1-integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res* 2018;**46**:D360–D370.
235. Gerstner N, Kehl T, Lenhof K, Müller A, Mayer C, Eckhart L, Grammes NL, Diener C, Hart M, Hahn O, Walter J, Wyss-Coray T, Meese E, Keller A, Lenhof HP. GeneTrail 3: advanced high-throughput enrichment analysis. *Nucleic Acids Res* 2020;**48**:W515–W520.
236. Frangogiannis NG. Cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res* 2021;**117**:1450–1488.
237. Doss JF, Corcoran DL, Jima DD, Telen MJ, Dave SS, Chi JT. A comprehensive joint analysis of the long and short RNA transcriptomes of human erythrocytes. *BMC Genomics* 2015;**16**.
238. Liu S, Tang L, Zhao X, Nguyen B, Heallen TR, Li M, Wang J, Wang J, Martin JF. Yap Promotes Noncanonical Wnt Signals From Cardiomyocytes for Heart Regeneration. *Circ Res* 2021;**129**:782–797.
239. Xin M, Kim Y, Sutherland LB, Murakami M, Qi X, McAnally J, Porrello ER, Mahmoud AI, Tan W, Shelton JM, Richardson JA, Sadek HA, Bassel-Duby R, Olson EN. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;**110**:13839–13844.
240. Wang J, Liu S, Heallen T, Martin JF. The Hippo pathway in the heart: pivotal roles in development, disease, and regeneration. *Nat Rev Cardiol* 2018;**15**:672–684.
241. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an

- intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol* 2021;**18**:1106–1121.
242. Zheng X, Zhong T, Ma Y, Wan X, Qin A, Yao B, Zou H, Song Y, Yin D. Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiomyocyte pyroptosis via caspase-3/GSDME. *Life Sci* 2020;**242**.
243. Yang S, Thor AD, Edgerton S, Yang X. Caspase-3 mediated feedback activation of apical caspases in doxorubicin and TNF-alpha induced apoptosis. *Apoptosis* 2006;**11**:1987–1997.
244. Asakura T, Sawai T, Hashidume Y, Ohkawa Y, Yokoyama S, Ohkawa K. Caspase-3 activation during apoptosis caused by glutathione-doxorubicin conjugate. *Br J Cancer* 1999;**80**:711–715.
245. Vaziri ND, Wang XQ, Oveisi F, Rad B. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 2000;**36**:142–146.
246. Long DJ, Jaiswal AK. NRH:quinone oxidoreductase2 (NQO2). *Chem Biol Interact* 2000;**129**:99–112.
247. Pacher P, Liaudet L, Bai P, Mabley JG, Kaminski PM, Virág L, Deb A, Szabó É, Ungvári Z, Wolin MS, Groves JT, Szabó C. Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation* 2003;**107**:896–904.
248. Neilan TG, Blake SL, Ichinose F, Raheer MJ, Buys ES, Jassal DS, Furutani E, Perez-Sanz TM, Graveline A, Janssens SP, Picard MH, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD. Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by doxorubicin. *Circulation* 2007;**116**:506–514.
249. Biswas M, Chan JY. Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;**244**:16–20.
250. Xu J, Su X, Burley SK, Zheng XFS. Nuclear SOD1 in Growth Control, Oxidative Stress Response, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Cancer. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2022;**11**.
251. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2019;**2019**.

252. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 2008;**22**:305–310.
253. Wallace KB, Sardão VA, Oliveira PJ. Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Circ Res* 2020;**126**:926–941.
254. Tonomura Y, Matsushima S, Kashiwagi E, Fujisawa K, Takagi S, Nishimura Y, Fukushima R, Torii M, Matsubara M. Biomarker panel of cardiac and skeletal muscle troponins, fatty acid binding protein 3 and myosin light chain 3 for the accurate diagnosis of cardiotoxicity and musculoskeletal toxicity in rats. *Toxicology* 2012;**302**:179–189.
255. Norton N, Bruno KA, Florio DN Di, Whelan ER, Hill AR, Morales-Lara AC, Mease AA, Sousou JM, Malavet JA, Dorn LE, Salomon GR, Macomb LP, Khatib S, Anastasiadis ZP, Necela BM, McGuire MM, Giresi PG, Kotha A, Beetler DJ, Weil RM, Landolfo CK, Fairweather D. Trpc6 Promotes Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Male Mice With Pleiotropic Differences Between Males and Females. *Front Cardiovasc Med* 2022;**8**.
256. Pierantozzi E, Szentesi P, Paolini C, Dienes B, Fodor J, Oláh T, Colombini B, Rassier DE, Rubino EM, Lange S, Rossi D, Csernoch L, Bagni MA, Reggiani C, Sorrentino V. Impaired Intracellular Ca²⁺ Dynamics, M-Band and Sarcomere Fragility in Skeletal Muscles of Obscurin KO Mice. *Int J Mol Sci* 2022;**23**.
257. Gessner G, Runge S, Koenen M, Heinemann SH, Koenen M, Haas J, Meder B, Thomas D, Katus HA, Schweizer PA. ANK2 functionally interacts with KCNH2 aggravating long QT syndrome in a double mutation carrier. *Biochem Biophys Res Commun* 2019;**512**:845–851.
258. Shen C, Xu L, Han S, Dong Z, Zhao X, Wang S, Qian S, Li B, Ma X, Wang P, Zhu H, Zou Y, Fan Z, Ge J, Sun A. Novel idiopathic DCM-related SCN5A variants localised in DI-S4 predispose electrical disorders by reducing peak sodium current density. *J Med Genet* 2017;**54**:762–770.
259. Frangogiannis NG. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *J Exp Med* 2020;**217**.
260. Frangogiannis NG. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev* 2012;**92**:635–688.

261. Bouzeghrane F, Reinhardt DP, Reudelhuber TL, Thibault G. Enhanced expression of fibrillin-1, a constituent of the myocardial extracellular matrix in fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;**289**.
262. Gaggin HK, Januzzi JL. Biomarkers and diagnostics in heart failure. *Biochim Biophys Acta* 2013;**1832**:2442–2450.
263. Ndrepepa G, Kastrati A. Creatine kinase myocardial band - a biomarker to assess prognostically relevant periprocedural myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2018;**270**:118–119.
264. Rochette L, Dogon G, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. GDF15 and Cardiac Cells: Current Concepts and New Insights. *Int J Mol Sci* 2021;**22**.
265. Zhao XS, Ren Y, Wu Y, Ren HK, Chen H. MiR-30b-5p and miR-22-3p restrain the fibrogenesis of post-myocardial infarction in mice via targeting PTAFR. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020;**24**:3993–4004.
266. Wang K, An T, Zhou LY, Liu CY, Zhang XJ, Feng C, Li PF. E2F1-regulated miR-30b suppresses Cyclophilin D and protects heart from ischemia/reperfusion injury and necrotic cell death. *Cell Death Differ* 2015;**22**:743–754.
267. Raso A, Dirx E, Philippen LE, Fernandez-Celis A, Majo F De, Sampaio-Pinto V, Sansonetti M, Juni R, Azzouzi H el, Calore M, Bitsch N, Olieslagers S, Oerlemans MIFJ, Huibers MM, Weger RA de, Reckman YJ, Pinto YM, Zentilin L, Zacchigna S, Giacca M, Costa Martins PA da, López-Andrés N, Windt LJ De. Therapeutic Delivery of miR-148a Suppresses Ventricular Dilation in Heart Failure. *Mol Ther* 2019;**27**:584–599.
268. Dai Y, Wang S, Chang S, Ren D, Shali S, Li C, Yang H, Huang Z, Ge J. M2 macrophage-derived exosomes carry microRNA-148a to alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury via inhibiting TXNIP and the TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2020;**142**:65–79.
269. Aonuma T, Moukette B, Kawaguchi S, Barupala NP, Sepúlveda MN, Frick K, Tang Y, Guglin M, Raman S V., Cai C, Liangpunsakul S, Nakagawa S, Kim IM. MiR-150 Attenuates Maladaptive Cardiac Remodeling Mediated by Long Noncoding RNA MIAT and Directly Represses Profibrotic Hoxa4. *Circ Heart Fail* 2022;**15**:E008686.

270. Shen J, Xing W, Gong F, Wang W, Yan Y, Zhang Y. MiR-150-5p retards the progression of myocardial fibrosis by targeting EGR1. *Cell Cycle* 2019;**18**:1335–1348.
271. Zhu XG, Zhang TN, Wen R, Liu CF. Overexpression of miR-150-5p Alleviates Apoptosis in Sepsis-Induced Myocardial Depression. *Biomed Res Int* 2020;**2020**.
272. Tang Y, Wang Y, Park K, Hu Q, Teoh J, Broskova Z, Ranganathan P, Jayakumar C, Li J, Su H, Tang Y, Ramesh G, Kim I. MicroRNA-150 protects the mouse heart from ischaemic injury by regulating cell death. 2015:387–397.
273. Zhang Y, Huang R, Zhou W, Zhao Q, Lü Z. miR-192-5p mediates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes via targeting of FABP3. *J Biochem Mol Toxicol* 2017;**31**.
274. Roca-Alonso L, Castellano L, Mills A, Dabrowska AF, Sikkel MB, Pellegrino L, Jacob J, Frampton AE, Krell J, Coombes RC, Harding SE, Lyon AR, Stebbing J. Myocardial MiR-30 downregulation triggered by doxorubicin drives alterations in β -adrenergic signaling and enhances apoptosis. *Cell Death Dis* 2015;**6**.
275. Pereira JD, Tosatti JAG, Simões R, Luizon MR, Gomes KB, Alves MT. microRNAs associated to anthracycline-induced cardiotoxicity in women with breast cancer: A systematic review and pathway analysis. *Biomed Pharmacother* 2020;**131**.
276. Ryoo I geun, Kwak MK. Regulatory crosstalk between the oxidative stress-related transcription factor Nfe2l2/Nrf2 and mitochondria. *Toxicol Appl Pharmacol* 2018;**359**:24–33.
277. Li Y, Zhao T, Li J, Xia M, Li Y, Wang X, Liu C, Zheng T, Chen R, Kan D, Xie Y, Song J, Feng Y, Yu T, Sun P. Oxidative Stress and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE): Implications in the Pathogenesis and Treatment of Aging-related Diseases. *J Immunol Res* 2022;**2022**.
278. Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods Mol Biol* 2011;**682**:3–13.
279. Kanisicak O, Khalil H, Ivey MJ, Karch J, Maliken BD, Correll RN, Brody MJ, Lin SCJ, Aronow BJ, Tallquist MD, Molkenstin JD. Genetic lineage tracing defines

- myofibroblast origin and function in the injured heart. *Nat Commun* 2016;**7**.
280. Nagaraju CK, Robinson EL, Abdesselem M, Trenson S, Dries E, Gilbert G, Janssens S, Cleemput J Van, Rega F, Meyns B, Roderick HL, Driesen RB, Sipido KR. Myofibroblast Phenotype and Reversibility of Fibrosis in Patients With End-Stage Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 2019;**73**:2267–2282.
281. Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev* 2016;**30**:1–17.
282. Sun X, Sun P, Zhen D, Xu X, Yang L, Fu D, Wei C, Niu X, Tian J, Li H. Melatonin alleviates doxorubicin-induced mitochondrial oxidative damage and ferroptosis in cardiomyocytes by regulating YAP expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 2022;**437**.
283. Goukassian D, Arakelyan A, Brojakowska A, Bisselier M, Hakobyan S, Hadri L, Rai AK, Evans A, Sebastian A, Truongcao M, Gonzalez C, Bajpai A, Cheng Z, Dubey PK, Addya S, Mills P, Walsh K, Kishore R, Coleman M, Garikipati VNS. Space flight associated changes in astronauts' plasma-derived small extracellular vesicle microRNA: Biomarker identification. *Clin Transl Med* 2022;**12**.
284. Dronkers E, Wauters MMM, Goumans MJ, Smits AM. Epicardial TGF β and BMP Signaling in Cardiac Regeneration: What Lesson Can We Learn from the Developing Heart? *Biomolecules* 2020;**10**.
285. Collén A, Bergenheim N, Carlsson L, Chien KR, Hoge S, Gan LM, Fritsche-Danielson R. VEGFA mRNA for regenerative treatment of heart failure. *Nat Rev Drug Discov* 2022;**21**:79–80.
286. Luo Y, Dong HY, Zhang B, Feng Z, Liu Y, Gao YQ, Dong MQ, Li ZC. miR-29a-3p attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting pulmonary adventitial fibroblast activation. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 2015;**65**:414–420.
287. Sun S, Li L, Dong L, Cheng J, Zhao C, Bao C, Wang H. Circulating mRNA and microRNA profiling analysis in patients with ischemic stroke. *Mol Med Rep* 2020;**22**:792–802.
288. Yao D, Zhou Z, Wang P, Zheng L, Huang Y, Duan Y, Liu B, Li Y. MiR-125-5p/IL-6R axis regulates macrophage inflammatory response and intestinal epithelial

- cell apoptosis in ulcerative colitis through JAK1/STAT3 and NF- κ B pathway. *Cell Cycle* 2021;**20**:2547–2564.
289. Mayorga ME, Penn MS. miR-145 is differentially regulated by TGF- β 1 and ischaemia and targets Disabled-2 expression and wnt/ β -catenin activity. *J Cell Mol Med* 2012;**16**:1106–1113.
290. Hong Y, He H, Jiang G, Zhang H, Tao W, Ding Y, Yuan D, Liu J, Fan H, Lin F, Liang X, Li X, Zhang Y. miR-155-5p inhibition rejuvenates aged mesenchymal stem cells and enhances cardioprotection following infarction. *Aging Cell* 2020;**19**.
291. Gryshkova V, Fleming A, Mcghan P, Ron P De, Fleurance R, Valentin J, Nogueira A. miR-21-5p as a potential biomarker of inflammatory infiltration in the heart upon acute drug-induced cardiac injury in rats. *Toxicol Lett* 2018;**286**:31–38.
292. Du Y, Liu G, Zhao L, Yao R. Protective Effect of miR-204 on Doxorubicin-Induced Cardiomyocyte Injury via HMGB1. *Oxid Med Cell Longev* 2020;**2020**.
293. Lai L, Chen J, Wang N, Zhu G, Duan X, Ling F. MiRNA-30e mediated cardioprotection of ACE2 in rats with Doxorubicin-induced heart failure through inhibiting cardiomyocytes autophagy. *Life Sci* 2017;**169**:69–75.
294. Gao F, Kataoka M, Liu N, Liang T, Huang ZP, Gu F, Ding J, Liu J, Zhang F, Ma Q, Wang Y, Zhang M, Hu X, Kyselovic J, Hu X, Pu WT, Wang J, Chen J, Wang DZ. Therapeutic role of miR-19a/19b in cardiac regeneration and protection from myocardial infarction. *Nat Commun* 2019;**10**.
295. Jin HY, Gonzalez-martin A, Miletic A V, Lai M, Knight S. Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. 2015;**6**:1–23.